

Aus der Klinik für Klauentierkrankheiten
und Fortpflanzungskunde
im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
und aus dem Institut für Tierproduktion
der Technischen Universität Berlin

Zur künstlichen Besamung beim Huhn
unter Verwendung von Tiefgefriersperma
und der intravaginalen Besamungstechnik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Uwe Bielefeldt
Tierarzt aus Lübeck

Berlin 1985
Journal Nr. 1257

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner
Erster Gutachter: Prof. Dr. D. Rohloff
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Horst

Tag der Promotion: 21. November 1985

1.	Einleitung	1
2.	Die Entwicklung der Wissenschaften	2
2.1	Die Naturwissenschaften	2
2.1.1	Die Astronomie	2
2.1.2	Die Physik	2
2.1.3	Die Chemie	2
2.1.4	Die Biologie	2
2.1.5	Die Geologie	2
2.1.6	Die Meteorologie	2
2.1.7	Die Astronomie	2
2.1.8	Die Physik	2
2.1.9	Die Chemie	2
2.1.10	Die Biologie	2
2.1.11	Die Geologie	2
2.1.12	Die Meteorologie	2
2.1.13	Die Astronomie	2
2.1.14	Die Physik	2
2.1.15	Die Chemie	2
2.1.16	Die Biologie	2
2.1.17	Die Geologie	2
2.1.18	Die Meteorologie	2
2.1.19	Die Astronomie	2
2.1.20	Die Physik	2
2.1.21	Die Chemie	2
2.1.22	Die Biologie	2
2.1.23	Die Geologie	2
2.1.24	Die Meteorologie	2
2.1.25	Die Astronomie	2
2.1.26	Die Physik	2
2.1.27	Die Chemie	2
2.1.28	Die Biologie	2
2.1.29	Die Geologie	2
2.1.30	Die Meteorologie	2
2.1.31	Die Astronomie	2
2.1.32	Die Physik	2
2.1.33	Die Chemie	2
2.1.34	Die Biologie	2
2.1.35	Die Geologie	2
2.1.36	Die Meteorologie	2
2.1.37	Die Astronomie	2
2.1.38	Die Physik	2
2.1.39	Die Chemie	2
2.1.40	Die Biologie	2
2.1.41	Die Geologie	2
2.1.42	Die Meteorologie	2
2.1.43	Die Astronomie	2
2.1.44	Die Physik	2
2.1.45	Die Chemie	2
2.1.46	Die Biologie	2
2.1.47	Die Geologie	2
2.1.48	Die Meteorologie	2
2.1.49	Die Astronomie	2
2.1.50	Die Physik	2
2.1.51	Die Chemie	2
2.1.52	Die Biologie	2
2.1.53	Die Geologie	2
2.1.54	Die Meteorologie	2
2.1.55	Die Astronomie	2
2.1.56	Die Physik	2
2.1.57	Die Chemie	2
2.1.58	Die Biologie	2
2.1.59	Die Geologie	2
2.1.60	Die Meteorologie	2
2.1.61	Die Astronomie	2
2.1.62	Die Physik	2
2.1.63	Die Chemie	2
2.1.64	Die Biologie	2
2.1.65	Die Geologie	2
2.1.66	Die Meteorologie	2
2.1.67	Die Astronomie	2
2.1.68	Die Physik	2
2.1.69	Die Chemie	2
2.1.70	Die Biologie	2
2.1.71	Die Geologie	2
2.1.72	Die Meteorologie	2
2.1.73	Die Astronomie	2
2.1.74	Die Physik	2
2.1.75	Die Chemie	2
2.1.76	Die Biologie	2
2.1.77	Die Geologie	2
2.1.78	Die Meteorologie	2
2.1.79	Die Astronomie	2
2.1.80	Die Physik	2
2.1.81	Die Chemie	2
2.1.82	Die Biologie	2
2.1.83	Die Geologie	2
2.1.84	Die Meteorologie	2
2.1.85	Die Astronomie	2
2.1.86	Die Physik	2
2.1.87	Die Chemie	2
2.1.88	Die Biologie	2
2.1.89	Die Geologie	2
2.1.90	Die Meteorologie	2
2.1.91	Die Astronomie	2
2.1.92	Die Physik	2
2.1.93	Die Chemie	2
2.1.94	Die Biologie	2
2.1.95	Die Geologie	2
2.1.96	Die Meteorologie	2
2.1.97	Die Astronomie	2
2.1.98	Die Physik	2
2.1.99	Die Chemie	2
2.1.100	Die Biologie	2
2.1.101	Die Geologie	2
2.1.102	Die Meteorologie	2
2.1.103	Die Astronomie	2
2.1.104	Die Physik	2
2.1.105	Die Chemie	2
2.1.106	Die Biologie	2
2.1.107	Die Geologie	2
2.1.108	Die Meteorologie	2
2.1.109	Die Astronomie	2
2.1.110	Die Physik	2
2.1.111	Die Chemie	2
2.1.112	Die Biologie	2
2.1.113	Die Geologie	2
2.1.114	Die Meteorologie	2
2.1.115	Die Astronomie	2
2.1.116	Die Physik	2
2.1.117	Die Chemie	2
2.1.118	Die Biologie	2
2.1.119	Die Geologie	2
2.1.120	Die Meteorologie	2
2.1.121	Die Astronomie	2
2.1.122	Die Physik	2
2.1.123	Die Chemie	2
2.1.124	Die Biologie	2
2.1.125	Die Geologie	2
2.1.126	Die Meteorologie	2
2.1.127	Die Astronomie	2
2.1.128	Die Physik	2
2.1.129	Die Chemie	2
2.1.130	Die Biologie	2
2.1.131	Die Geologie	2
2.1.132	Die Meteorologie	2
2.1.133	Die Astronomie	2
2.1.134	Die Physik	2
2.1.135	Die Chemie	2
2.1.136	Die Biologie	2
2.1.137	Die Geologie	2
2.1.138	Die Meteorologie	2
2.1.139	Die Astronomie	2
2.1.140	Die Physik	2
2.1.141	Die Chemie	2
2.1.142	Die Biologie	2
2.1.143	Die Geologie	2
2.1.144	Die Meteorologie	2
2.1.145	Die Astronomie	2
2.1.146	Die Physik	2
2.1.147	Die Chemie	2
2.1.148	Die Biologie	2
2.1.149	Die Geologie	2
2.1.150	Die Meteorologie	2
2.1.151	Die Astronomie	2
2.1.152	Die Physik	2
2.1.153	Die Chemie	2
2.1.154	Die Biologie	2
2.1.155	Die Geologie	2
2.1.156	Die Meteorologie	2
2.1.157	Die Astronomie	2
2.1.158	Die Physik	2
2.1.159	Die Chemie	2
2.1.160	Die Biologie	2
2.1.161	Die Geologie	2
2.1.162	Die Meteorologie	2
2.1.163	Die Astronomie	2
2.1.164	Die Physik	2
2.1.165	Die Chemie	2
2.1.166	Die Biologie	2
2.1.167	Die Geologie	2
2.1.168	Die Meteorologie	2
2.1.169	Die Astronomie	2
2.1.170	Die Physik	2
2.1.171	Die Chemie	2
2.1.172	Die Biologie	2
2.1.173	Die Geologie	2
2.1.174	Die Meteorologie	2
2.1.175	Die Astronomie	2
2.1.176	Die Physik	2
2.1.177	Die Chemie	2
2.1.178	Die Biologie	2
2.1.179	Die Geologie	2
2.1.180	Die Meteorologie	2
2.1.181	Die Astronomie	2
2.1.182	Die Physik	2
2.1.183	Die Chemie	2
2.1.184	Die Biologie	2
2.1.185	Die Geologie	2
2.1.186	Die Meteorologie	2
2.1.187	Die Astronomie	2
2.1.188	Die Physik	2
2.1.189	Die Chemie	2
2.1.190	Die Biologie	2
2.1.191	Die Geologie	2
2.1.192	Die Meteorologie	2
2.1.193	Die Astronomie	2
2.1.194	Die Physik	2
2.1.195	Die Chemie	2
2.1.196	Die Biologie	2
2.1.197	Die Geologie	2
2.1.198	Die Meteorologie	2
2.1.199	Die Astronomie	2
2.1.200	Die Physik	2
2.1.201	Die Chemie	2
2.1.202	Die Biologie	2
2.1.203	Die Geologie	2
2.1.204	Die Meteorologie	2
2.1.205	Die Astronomie	2
2.1.206	Die Physik	2
2.1.207	Die Chemie	2
2.1.208	Die Biologie	2
2.1.209	Die Geologie	2
2.1.210	Die Meteorologie	2
2.1.211	Die Astronomie	2
2.1.212	Die Physik	2
2.1.213	Die Chemie	2
2.1.214	Die Biologie	2
2.1.215	Die Geologie	2
2.1.216	Die Meteorologie	2
2.1.217	Die Astronomie	2
2.1.218	Die Physik	2
2.1.219	Die Chemie	2
2.1.220	Die Biologie	2
2.1.221	Die Geologie	2
2.1.222	Die Meteorologie	2
2.1.223	Die Astronomie	2
2.1.224	Die Physik	2
2.1.225	Die Chemie	2
2.1.226	Die Biologie	2
2.1.227	Die Geologie	2
2.1.228	Die Meteorologie	2
2.1.229	Die Astronomie	2
2.1.230	Die Physik	2
2.1.231	Die Chemie	2
2.1.232	Die Biologie	2
2.1.233	Die Geologie	2
2.1.234	Die Meteorologie	2
2.1.235	Die Astronomie	2
2.1.236	Die Physik	2
2.1.237	Die Chemie	2
2.1.238	Die Biologie	2
2.1.239	Die Geologie	2
2.1.240	Die Meteorologie	2
2.1.241	Die Astronomie	2
2.1.242	Die Physik	2
2.1.243	Die Chemie	2
2.1.244	Die Biologie	2
2.1.245	Die Geologie	2
2.1.246	Die Meteorologie	2
2.1.247	Die Astronomie	2
2.1.248	Die Physik	2
2.1.249	Die Chemie	2
2.1.250	Die Biologie	2
2.1.251	Die Geologie	2
2.1.252	Die Meteorologie	2
2.1.253	Die Astronomie	2
2.1.254	Die Physik	2
2.1.255	Die Chemie	2
2.1.256	Die Biologie	2
2.1.257	Die Geologie	2
2.1.258	Die Meteorologie	2
2.1.259	Die Astronomie	2
2.1.260	Die Physik	2
2.1.261	Die Chemie	2
2.1.262	Die Biologie	2
2.1.263	Die Geologie	2
2.1.264	Die Meteorologie	2
2.1.265	Die Astronomie	2
2.1.266	Die Physik	2
2.1.267	Die Chemie	2
2.1.268	Die Biologie	2
2.1.269	Die Geologie	2
2.1.270	Die Meteorologie	2
2.1.271	Die Astronomie	2
2.1.272	Die Physik	2
2.1.273	Die Chemie	2
2.1.274	Die Biologie	2
2.1.275	Die Geologie	2
2.1.276	Die Meteorologie	2
2.1.277	Die Astronomie	2
2.1.278	Die Physik	2
2.1.279	Die Chemie	2
2.1.280	Die Biologie	2
2.1.281	Die Geologie	2
2.1.282	Die Meteorologie	2
2.1.283	Die Astronomie	2
2.1.284	Die Physik	2
2.1.285	Die Chemie	2
2.1.286	Die Biologie	2
2.1.287	Die Geologie	2
2.1.288	Die Meteorologie	2
2.1.289	Die Astronomie	2
2.1.290	Die Physik	2
2.1.291	Die Chemie	2
2.1.292	Die Biologie	2
2.1.293	Die Geologie	2
2.1.294	Die Meteorologie	2
2.1.295	Die Astronomie	2
2.1.296	Die Physik	2
2.1.297	Die Chemie	2
2.1.298	Die Biologie	2
2.1.299	Die Geologie	2
2.1.300	Die Meteorologie	2

Meinem Vater gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Anatomie	2
2.1.1 Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane	2
2.1.2 Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane	3
2.2 Beschaffenheit des Hahnenspermas und seine Befruchtungspersistenz	5
2.3 Samengewinnungsmethoden	7
2.4 Besamungstechniken	9
2.5 Konservierung von Hahnensperma bei Tempera- turen über dem Gefrierpunkt	12
2.6 Konservierung von Hahnensperma bei tiefen Temperaturen	16
2.7 Gefrierschutzsubstanzen	18
2.7.1 Erfahrungen mit Glycerin	19
2.7.2 Erfahrungen mit Dimethylsulfoxid (DMSO)	26
2.7.3 Erfahrungen mit anderen Kryoprotektiva	28
2.8 Auswirkungen der Zentrifugation auf Hahnensperma	31
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	33
3.1 Material und Methode	33
3.1.1 Tiermaterial	33
3.1.2 Samengewinnung	33
3.1.3 Beurteilung der Ejakulate	34
3.1.4 Verdünnung und Konservierung der Ejakulate ...	34
3.1.5 Glycerinentfernung durch Zentrifugation	35
3.1.6 Besamungstechnik	36
3.1.7 Versuchsanordnung	37
3.1.8 Versuchsauswertung	39

3.1.9	Statistische Methoden	40
3.2	Versuchsergebnisse	44
3.2.1	Vorversuche	44
3.2.2	Hauptversuche	49
3.2.2.1	Vergleich zwischen flacher und tiefer intra- vaginaler Besamung (Versuchsabschnitt I)	49
3.2.2.2	Tiefe intravaginale Besamung bei Verwendung von Sperma mit den Verdünnungsraten 1:2, 1:4 und 1:6 (Samen : Verdünner) (Versuchsab- schnitt II)	57
3.2.2.3	Effekte der Zentrifugation auf die Motilität von Hahnenspermien (Versuchsabschnitt III) ...	65
3.2.2.4	Tiefe intravaginale Insemination nach Entfer- nung des Glycerins durch Zentrifugation (Ver- suchsabschnitt IV)	76
4.	DISKUSSION	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	110
6.	SUMMARY	112
7.	LITERATURVERZEICHNIS	114

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung der kryoprotektiven Wirkung des Glycerins bei der Spermakonservierung durch POLGE und Mitarbeiter (1949) eröffneten sich zunehmend Möglichkeiten, die Tiefgefrierkonservierung von Samenzellen für die Tierproduktion zu nutzen. Vor allem für die Anlage wertvoller Genreservoirs, auf die der Züchter noch nach jahrelanger Lagerung zurückgreifen kann, ist diese Konservierungsmethode sehr wertvoll und wird seit dieser Zeit weltweit mit Erfolg praktiziert.

Die Empfindlichkeit von Hahnenspermien gegenüber tiefen Temperaturen ließ eine Anwendung der künstlichen Besamung mit Tiefgefriersperma bei dieser Tierart in der Praxis bisher nicht zu. Auch wenn auf diesem Gebiet in den letzten Jahren Fortschritte erzielt wurden, so weisen jedoch alle entwickelten Verfahren neben der geringeren Befruchtungsfähigkeit der aufgetauten Spermien den Nachteil auf, daß ein hoher Prozentsatz der Samenzellen durch die Tiefgefrierung morphologisch geschädigt wird. Da wegen dieser Schädigungen große Spermienzahlen pro Besamungsportion notwendig werden bzw. komplizierte Besamungstechniken angewandt werden müssen, wird die Effektivität der künstlichen Besamung mit Tiefgefriersperma beim Haushuhn bisher erheblich eingeschränkt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll sein, ein Tiefgefrierverfahren auf seine Praxistauglichkeit zu prüfen und Aufschluß darüber zu erhalten, unter welchen Bedingungen mit Glycerin als Kryoprotektivum die besten Befruchtungserfolge in der Besamungspraxis zu erzielen sind.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Anatomie

Die Anatomie des Genitalapparates beim Geflügel unterscheidet sich erheblich von dem unserer übrigen landwirtschaftlichen Nutztiere. Da eine eingehende Beschreibung der Geschlechtsorgane des Geflügels den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde, soll lediglich auf die wesentlichen, zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen, anatomischen Gegebenheiten eingegangen, darüber hinaus jedoch auf die anatomischen Standardwerke verwiesen werden.

2.1.1 Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane

Die männlichen Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina) des Geflügels unterscheiden sich von denen der Säugetiere vor allem durch die Lage der Hoden, das Fehlen akzesorischer Geschlechtsdrüsen, die artspezifische Ausbildung des Begattungsorgans und die Existenz einer Kloake (GRAU, 1943; v. RAUTENFELD, 1973; REMMERS, 1973; SCHUMMER, 1973; KING u. McLELLAND, 1978; SCHWARZE u. SCHRÖDER, 1985).

Der männliche Vogel besitzt zwei bohnenförmige, symmetrisch angeordnete Hoden, die am Ort ihrer Entstehung unter der Wirbelsäule liegen und mit ihrem medialen Rand durch ein kurzes Gekröse zwischen Lunge und Niere befestigt sind. Der Nebenhoden des Hahnes, der im Gegensatz zu anderen Tierarten nur schwach entwickelt ist, besteht nach LAKE (1957a) und REMMERS (1973) aus dem extratestikulären Rete testis, den Ductuli efferentes, dem Ductus epididymidis und als Überbleibsel der Urnierenanlage den Ductuli aberrantes, sowie zystenartigen und verschlungenen epithelialen Tubuli. Die Nebenhodenkanäle gehen ohne scharfe Begrenzung in den Samenleiter (Ductus deferens) über. Dieser begleitet den gleich-

seitigen Harnleiter und dringt dorsal in die Kloakenwand ein, um lateral der Ureteröffnung auf einer kleinen Papille zu münden.

Akzessorische Geschlechtsdrüsen sind beim Geflügel nicht vorhanden, und der in die Kloakenwand einbezogene Endteil des Samenleiters, die sogenannte "Ampulla ductus deferentis" (REMMERS, 1973) ist beim Haushahn (*Gallus domesticus*) im Gegensatz zum Wassergeflügel nur sehr gering ausgebildet und weder physiologisch noch anatomisch mit der Samenleiterampulle der Säugetiere vergleichbar.

Während bei den Wasservögeln ein dem Penis der Säugetiere vergleichbares Organ ausgebildet ist, findet sich beim Hahn nur ein rudimentäres Kopulationsorgan. Es besteht aus einem zentralen und zwei lateralen phalloiden Körpern, die unterschiedlich zueinander angeordnet sein können (v. RAUTENFELD, 1973) und einer bis zur Penisspitze, die durch den zentralen Phalluskörper geformt wird, reichenden medianen Furche, sowie aus zwei Lymphbildungsräumen. Eine Erektion des Phallus erfolgt durch das Einströmen von Lymphe vor allem in die lateralen Phalluskörper, die an Umfang erheblich zunehmen. Durch diese Erektion wird beim Tretakt der Phallus rasch ein- und ausgestülpt und somit eine Verbindung zum Ovidukt des weiblichen Tieres hergestellt. Das Sperma fließt bei der Ejakulation über die Samenleiter nach außen über diese mediane Furche des Phallus ab.

2.1.2 Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane

Der Genitalapparat (Organa genitalia feminina) der Henne unterscheidet sich von dem der Säugetiere durch die rudimentäre Ausbildung der linksseitig im Körper angelegten Geschlechtsorgane, die im Hinblick auf die Schalenbildungsartspezifische Funktion des Eileiters und die Existenz einer Kloake (FRÜBÖSE, 1928; SCHUMMER, 1973; LÜFFLER, 1978; KING

u. McLELLAND, 1978; SCHWARZE u. SCHRÖDER, 1985).

Trotz paariger Anlage ist bei der Henne nur der linke Eierstock vollständig ausgebildet und liegt, mit einem kurzen Mesovarium befestigt, kranioventral des anterioren linken Nierenlappens. Zur Zeit der Geschlechtsreife wiegt er zwischen 35 und 40 g und hat aufgrund der in den verschiedensten Entwicklungsstadien vorliegenden Follikeln ein traubenähnliches Aussehen. Die größeren dieser dunkelgelben Follikel sind stielartig mit dem Ovar verbunden und bestehen aus Eizelle (Oozyte), dem umgebenden aus der Zona radiata und der Zona granulosa gebildeten Follikelepithel und einer zweischichtigen bindegewebigen Theca folliculi. Das Wachstum dieser Follikel beruht auf einer schichtweisen Einlagerung von Dotter in die Eizelle.

Der linke, voll entwickelte Eileiter (Ovidukt) wird wegen seiner Funktion auch als "Legedarm" bezeichnet. Er dient nicht nur dem Auffangen und Weiterleiten der Eizelle, sondern übernimmt auch die Bildung von Eiweiß, Schalenhaut und Kalkschale. Der Eileiter erreicht bei dieser Tierart eine Länge von 60-70 cm und läßt sich morphologisch in fünf Abschnitte unterteilen:

- (1) Der trichterförmige Anfangsteil, das Infundibulum, dient der Aufnahme der aus dem Ovar ausgeschiedenen dotterreichen Eizelle. Neben dem Trichter hat das Infundibulum noch einen röhrenförmigen Endteil, in dem die Befruchtung stattfindet.
- (2) Der Eileiter im engeren Sinne, das Magnum, ist der längste Abschnitt des "Legedarms" und in ihm findet die Bildung der Eiweißschicht statt.
- (3) Der anschließende Isthmus, in dem die Schalenhaut produziert wird, ist deutlich im Durchmesser reduziert.
- (4) Im sackartigen anschließenden Uterus wird die Kalkschale gebildet.
- (5) Die s-förmig gewundene röhrenartige Vagina schließt sich an als Bildungsort für die Kutikula des Eies und hat,

künstlich gestreckt, beim Haushuhn eine Länge von ca. 8 cm (KING u. McLELLAND, 1978). Im uterovaginalen Teil der Vagina befindet sich eine spermienspeichernde Drüsenregion (BOBR u. Mitarb., 1962; FUJII u. TAMURA, 1963). Die Vagina mündet mit weiter, schlitzförmiger Öffnung in das Urodaeum der Kloake.

2.2 Beschaffenheit des Hahnenspermas und seine Befruchtungspersistenz

Im Gegensatz zu Säugetierspermien gehen bei der morphologisch normalen fadenförmigen Samenzelle des Hahnes Akrosom-, Kopf-, Mittelstück und Schwanzregion fast unmerklich ineinander über (GRIGG u. HODGE, 1949; KASHIWABARA, 1964; LAKE, 1974). Die Samenzelle des Hahnes ist mit einer Gesamtlänge von ca. 120 µm mehr als doppelt so lang wie z.B. das Spermium des Ebers. Der im Gegensatz zu Säugerspermien langgezogene schmale Kopf wird nach BERGMANN und SCHRAMM (1979) in Akrosomkappe, Akrosomdorn und Kernanteil eingeteilt.

Nach MANN (1964) kann ein Säugetierejakulat als eine Suspension aus Spermien und flüssigem Samenplasma bezeichnet werden. Ejakulate von Hähnen enthalten zusätzlich ein sogenanntes "transparent fluid" (NISHIYAMA, 1951), das während der Ejakulation durch das Oberflächenepithel ausströmt (VAN WAMBEKE, 1980) und dessen Bedeutung in der Literatur unterschiedlich interpretiert wird. LAKE (1957b, 1971), COOPER (1965) und VAN WAMBEKE (1976) sind der Ansicht, daß das "transparent fluid" kein natürlicher Bestandteil des Spermas ist, da es lediglich bei der Entsamung durch das Ausdrücken der Endabschnitte der Samenleiter abgegeben wird. GROVE und TIEFENBACH (1961) machen auf die spermienagglutinierende Wirkung dieses "Transsudats" aufmerksam, und PINGEL und JEROCH (1980) weisen auf die membranschädigende Wirkung dieser Flüssigkeit hin. Im Gegensatz dazu sind andere Auto-

ren der Meinung, daß Samenplasma und "transparent fluid" als gleichwertige Bestandteile des Spermas anzusehen sind (LORENZ, 1969; TERADA u. WATANABE, 1978).

Qualitativ hochwertige Ejakulate sind perlweiß und von rahmähnlicher Konsistenz. Das Volumen eines Einzelejakulates und die Dichte ist nach YAMANE und Mitarbeitern (1966) unter anderem von der Art der Entsamungstechnik abhängig. BUSCH und Mitarbeiter (1982) geben für das Ejakulatvolumen 0,3-1,5 ml und für die Dichte $1,5-4,5 \times 10^6$ Spermien/ μ l an. Volumenreicher und dichter sind danach die Ejakulate der schweren Rassen. LAKE und STEWART (1978b) geben dagegen nur Werte von 0,15-0,35 ml für das Volumen bzw. 5×10^6 Spermien/ μ l für die Dichte an, wobei auf eine Rassen- und Linienabhängigkeit verwiesen wird.

Bei den zwischen 6,8-8,4 schwankenden Angaben für den pH-Wert (MANN, 1964; LAKE, 1974) muß berücksichtigt werden, daß Beimengungen von "transparent fluid", Kot oder Harn sowie Zeitpunkt der Messung nach der Ejakulatgewinnung auf den pH-Wert Einfluß nehmen können.

Weitere Einflüsse auf diese Spermaparameter haben die Haltungsbedingungen (SIEGEL u. BEANE, 1963), die Genetik (PINGEL u. HENKER, 1975), die Jahreszeit (SCHINDLER u. Mitarb., 1957; SAEID u. AL SOUDI, 1975) sowie das Alter der Hähne (CLARK u. SARAHOON, 1967; GLEICHAUF, 1973).

Die Spermakonservierung in vivo ist eine fortpflanzungsphysiologische Besonderheit des Geflügels. Durch diese Befruchtungspersistenz haben die Spermien im weiblichen Genitale eine durchschnittliche Befruchtungsfähigkeit von 10-14 Tagen (KAMAR u. HAFEZ, 1975), maximal 19 Tage (THIBAUT, 1973). Die Geflügelspermien verdanken ihre verlängerte Überlebens- und Befruchtungsfähigkeit dem Vorhandensein spezieller spermienspeichernder Drüsenregionen (sperm host glands), worin sie nach NEVO und SCHINDLER (1968) reversibel inaktiviert lagern. VAN DRIMMELEN beschrieb 1946 zum ersten Mal diese Drüsen, die er im Bereich des Infundibulums entdeckt

hatte. Ähnliche Drüsen wurden dann später in der Region der uterovaginalen Verbindung gefunden (BOBR u. Mitarb., 1962; FUJII u. TAMURA, 1963), die von BOBR und Mitarbeitern (1964) als die normalen Speicher der Spermien bezeichnet wurden. Nach natürlicher Anpaarung oder nach intravaginaler Besamung sind diese uterovaginalen Speicher vollständig mit Spermien besetzt, während in den Drüsen des Infundibulums kaum Spermien gefunden werden. Tote Spermien sind nicht in der Lage, in die Drüsen einzudringen (FUJII u. TAMURA, 1963; TAKEDA, 1964), sie werden bei intravaginaler Insemination resorbiert oder über die Kloake wieder ausgeschieden (TAKEDA, 1974). Untersuchungen von ALLEN und GRIGG (1957) sowie TAKEDA (1974) deuten darauf hin, daß der Spermatransport innerhalb der Vagina aktiv, d.h. durch die Eigenbewegung der Spermien, erfolgt, während die weitere Fortbewegung im Uterus bis hin zum Infundibulum passiver Natur ist. Motilitätsgeschädigte Spermien, z.B. nach Tiefgefrierung, befruchten danach nur nach intrauteriner Besamung.

Über die Freisetzung der Spermien aus den Drüsen gibt es unterschiedliche Hypothesen. BURKE und Mitarbeiter (1972) vermuten ein ständiges Freisetzen einer kleinen Anzahl von Spermien, während GRIGG (1957) und TAKEDA (1967) ein periodisches Verlassen kleinerer Gruppen von Samenzellen durch die Dehnung der uterovaginalen Schwelle bei der Passage eines hartschaligen Eies für wahrscheinlicher halten. COMPTON und Mitarbeiter wiesen 1978 nach, daß keine vollständige Entleerung dieser Speicherdrüsen erfolgt, sondern nur die oberste Spermien-schicht freigesetzt wird, d.h. die zuletzt eingelagerten Spermien verlassen die Drüsen zuerst.

2.3 Samengewinnungsmethoden

BURROWS und QUINN gelang es 1935 Ejakulationsreflexe bei Hähnen durch eine Abdominalmassage auszulösen. Diese Methode

wurde von denselben Autoren 1937 zu einer kombinierten Rücken- und Bauchmassage in Verbindung mit einem Ausdrücken der Endabschnitte der Samenleiter modifiziert. Sie hat sich als Methode der Wahl in der Besamungspraxis bewährt und durchgesetzt. Die übrigen bis dahin angewandten Verfahren zur Spermagewinnung waren allesamt kostspieliger und zeitaufwendiger. Darunter fallen die Samengewinnung aus den Samenleitern geschlachteter Hähne (IVANOV, 1913) sowie die Rückgewinnung des Spermas aus der Kloake der Hennen (PAYNE, 1914). Auch die Gewinnung während des Tretaktes in einem Gefäß, das zwischen die Geschlechtsorgane beider Partner gehalten wurde (AMANTEA, 1922), bzw. das an der Kloake der Henne oder der des Hahnes befestigt wurde (ISHIKAWA, 1930; TINJAKOV, 1933; PARKER, 1939) ist nicht mehr zeitgemäß. Die Elektroejakulation erwies sich nach Anwendung mit verschiedenen Variationen als unbrauchbar (DE SILVA, 1962; LAKE, 1967).

Die heute angewandten Verfahren beruhen alle auf der von BURROWS und QUINN (1935, 1937) entwickelten Massagetechnik und lassen sich unterscheiden nach der Anzahl der benötigten Personen in Ein- bzw. Zwei-Mann-Methoden. Bei der Zwei-Mann-Methode fixiert die erste Person den Hahn, während die zweite Person die Rücken- und Bauchmassage durchführt und anschließend das Ejakulat gewinnt (BURROWS u. QUINN, 1937; COOPER, 1955; ROMMEL, 1963), oder es erfolgt durch die erste Person die Fixation und die Stimulation des Hahnes, während der Operateur mit leichtem Druck die Kloakenregion komprimiert und so den Samen gewinnt (SCHUSTER, 1980). Bei der letzteren Methode konnte festgestellt werden, daß bei Hähnen, die sich an die Samengewinnung gewöhnt hatten, schon direkt nach der Fixation ohne Rückenmassage Sperma in zufriedenstellender Menge aufgefangen werden konnte. LAKE (1957b) verzichtet weitgehend auf das Auspressen der Endabschnitte der Samenleiter, um die Vermischung mit dem "transparent fluid" möglichst zu vermeiden. VAN DRIMMELEN beschrieb 1951 eine Ein-Mann-Methode, nach der der Hahn mit

Leder- oder Strickschlaufen fixiert wird. Nach BOGDANOFF und SHAFFNER (1954) sowie TULLOCH (1962) wird der Hahn zwischen den Oberschenkeln des sitzenden Entsamers fixiert, so daß dieser beide Hände für die Samengewinnung frei hat. Als sichere Fixation der Hähne sind spezielle "Cock-holder" von BURROWS und QUINN (1937) bzw. von YAMANE und Mitarbeitern (1966) entwickelt worden.

Spermaphroduktion sowie sexuelle Aktivität der Hähne unterliegen nach LAKE und WOOD-GUSH (1956) sowie MUKHERJEE (1974) einem festen Tagesrhythmus, wobei ein größeres Ejakulatvolumen mit einer erhöhten Spermiedichte bei Entsamungen am frühen Abend zu gewinnen ist. McDANIEL und SEXTON (1977) sowie LAKE und STEWART (1978b) halten eine dreimalige Samenentnahme in der Woche zur Erlangung einer maximalen Spermaqualität und -quantität für erforderlich. Auf keinen Fall sollten nach EL JACK und LAKE (1966) größere Trainingspausen entstehen, da die Autoren bei größeren Entsamungspausen eine erhöhte Anzahl morphologisch abnormer Spermien feststellen konnten.

2.4 Besamungstechniken

Außer der heute üblichen instrumentellen Besamung mit Applikation der Samenportion in die Vagina bzw. in den Uterus der Henne wurden auch andere Besamungsmethoden entwickelt, die aber in der Praxis heute keine Bedeutung mehr haben.

Bei der intramagnalen Besamung wird der Samen in das Magnum gebracht, wobei eine Laparotomie unerläßlich ist (VAN KREY u. Mitarb., 1964; LORENZ u. OGASAWARA, 1968). Lediglich bei der Verwendung morphologisch geschädigter Spermien sind im Vergleich zur intravaginalen Besamung erheblich bessere Befruchtungsergebnisse möglich (OGASAWARA u. Mitarb., 1969; PARK u. Mitarb., 1978).

Die intraperitoneale Inseminationsmethode ist nur für den Einsatz bei wissenschaftlichen Untersuchungen geeignet. Hierbei wird der Samen in die Bauchhöhle appliziert, und zwar in die Nähe des Infundibulums (KOSIN, 1944; VAN DRIMMEL, 1945). BROWN und Mitarbeiter (1963) wiesen bei dieser Methode eine schlechte Befruchtungsrate und eine hohe embryonale Mortalität nach, HARRIS (1968) dagegen erzielte bei Verwendung von Tiefgefriersperma gute Ergebnisse.

Die intrauterine Besamung ist auch heute noch in der Geflügelzucht beim Einsatz von Tiefgefriersperma gebräuchlich, d.h. von motilitätsgeschädigten Spermien, die nicht mehr in der Lage sind, die ca. 8 cm lange Vagina aus eigener Kraft zu durchwandern und zu den uterovaginalen Drüsen zu gelangen (ALLEN u. BOBR, 1955; ALLEN u. GRIGG, 1957; YAMANE u. Mitarb., 1966). Die Methode wird heute mit Erfolg von WATANABE und TERADA (1980a) angewandt, obwohl von BOBR und Mitarbeitern (1965) sowie GRIMM (1981) dabei ein deutlicher Rückgang der Legeleistung verzeichnet worden ist. OGASAWARA und Mitarbeiter (1966) setzten diese Besamungstechnik auch mit Erfolg bei Verwendung von Sperma ein, das bei intravaginaler Insemination schlechte Befruchtungsergebnisse aufwies. Nach ALLEN und BOBR (1955) sowie BROWN und Mitarbeitern (1965) wird der mit einem Fingerling überzogene und mit Paraffin gleitend gemachte Zeigefinger vom Besamer möglichst tief in die vorgelagerte Vagina eingeführt. Der uterovaginale Übergang wird aufgesucht, und unter dem Schutz des eingeführten Fingers wird der Besamungskatheter bis in den Uterus vorgeschoben.

In der Regel erfolgt heute die Besamung beim Hausgeflügel intravaginal. Dabei wird die Henne von einer Person waagrecht unter dem linken oder rechten Arm so fixiert, daß die Kloake des Tieres dem Besamer zugewandt ist. Die Schwanzfedern werden auf den Rücken des Tieres gedrückt, um den Kloakenbereich freizulegen. Durch Druck auf das Abdomen wird die Vagina hervorgelagert (GROVE u. TIEFENBACH, 1961; DE

SILVA, 1963; LAKE, 1974; GRIMM, 1981).

Über die optimale Tiefe der intravaginalen Insemination werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht, wobei zwischen einer flachen (1-3 cm tief) und einer tiefen (4-6 cm tief) Besamung unterschieden wird. Eine Besamungstiefe von 1-3 cm wird bei der Verwendung von Frischsperma von GROVE und TIEFENBACH (1961), KOSIN (1962) sowie McDANIEL (1976) empfohlen. Eine tiefe intravaginale Besamung halten LAKE (1974) sowie LAKE und STEWART (1978b) vor allem bei Verwendung von Tiefgefriersperma für zweckmäßig, wobei das Besamungsinstrument unter vorsichtig kreisenden Bewegungen die s-förmige Krümmung der Vagina überwinden muß, um das Sperma in den Bereich der uterovaginalen Drüsenregion zu bringen. Das Sperma darf nach diesen Autoren aber erst dann deponiert werden, wenn kein Druck mehr auf das Abdomen ausgeübt wird, d.h. wenn die vorgelagerte Vagina wieder in die normale Lage reponiert ist.

Auf einen Zusammenhang zwischen Besamungszeitpunkt und Fruchtbarkeit machen GRACEWSKI und SCOTT (1943) aufmerksam. Sie verweisen auf eine erhöhte Befruchtungsrate bei der natürlichen Anpaarung, wenn die Kopulation nur in den Nachmittagsstunden zugelassen wird. Untersuchungen von BORNSTEIN und Mitarbeitern (1960) sowie PARKER und ARSCOTT (1971) bestätigen diese Tatsache auch für die künstliche Besamung. Diese Gegebenheit scheint nicht an der Tageszeit per se zu liegen, sondern vielmehr daran, daß die Eiablage vorwiegend in den Morgenstunden erfolgt und daß bei frühmorgendlichen Besamungen eine vermehrte Anzahl von Hennen ein hartschaliges Ei im Uterus tragen. JOHNSTON und PARKER (1970) beobachteten auch noch dann sinkende Befruchtungsraten, wenn die Eiablage kurz vor der Besamung erfolgt ist. Der günstigste Besamungszeitpunkt wird von GIESEN und McDANIEL (1978) für Zuchthennen mit 21.00 Uhr angegeben. Hennen sollten einmal pro Woche besamt werden, da die Befruchtungsraten durch eine Vergrößerung des Inseminationsintervalls auf über sieben

Tage besonders bei der Verwendung von behandeltem Sperma erheblich absinken (SEXTON, 1977). Eine zweimalige Besamung pro Woche führt vor allem in der zweiten Hälfte der Legeperiode zu einer deutlichen Verbesserung der Befruchtungsergebnisse (McDANIEL u. COLEMAN, 1975; PINGEL u. JEROCH, 1980).

2.5 Konservierung von Hahnensperma bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt

Frisches Sperma von Hähnen behält, bei Raumtemperatur gehalten, nur eine kurze Zeit die volle Befruchtungsfähigkeit. Deshalb sollte nach GROVE (1963) sowie BUSCH und Mitarbeitern (1982) das Sperma innerhalb von 30-60 Minuten nach der Gewinnung zur Besamung verwendet werden. Bereits in den 30er Jahren wurde nach speziellen Konservierungsmedien gesucht, mit denen das Sperma verdünnt werden und ein Überleben der Samenzellen außerhalb des Körpers von mehreren Stunden erreicht werden konnte. Der Hauptvorteil der reinen Spermaverdünnung liegt in der besseren Ausnutzung des Hahnenspermas. So wird nach SEXTON (1976a) für die Besamung von 160 Hennen nur ein Hahn benötigt. Die Kurzzeitkonservierung hat seine Hauptbedeutung heute darin, daß in der künstlichen Besamung rationeller gearbeitet werden kann (BECHSTEDT u. Mitarb., 1975) und daß ein Austausch von konserviertem Sperma möglich ist (LAKE u. Mitarb., 1959). Als Nachteil der Konservierung ist die Herabsetzung der Befruchtungsfähigkeit der Spermien durch den Zusatz von Verdünnermedien zu erwähnen (LAKE, 1974; GRIMM, 1981), so daß im Gegensatz zur Verwendung von Frischsperma eine Erhöhung der Spermienanzahl (BUSCH u. Mitarb., 1982), bzw. ein kürzeres Besamungsintervall zu wählen ist (SEXTON, 1977).

Während sich zur Verdünnung des Spermas in der Besamungspraxis heute verschiedene physiologische Salzlösungen als

geeignet erwiesen haben, hat die Kurzzeitkonservierung bisher keine wesentliche Bedeutung erlangt. Es sind eine Reihe von Verfahren beschrieben worden, die eine gute Aufbewahrung der Spermien bis zu 48 Stunden ermöglichen, wobei sich mit wachsender Lagerungszeit ein signifikanter Abfall in der Befruchtungsrate einstellt (PHILLIPP u. Mitarb., 1974). Der Einsatz von physiologischen Salzlösungen für die Konservierung erfolgte schon sehr früh durch ISHIKAWA (1930), GRODZINSKI und MARCHLEWSKI (1935) und MUNRO (1938).

Da die Ergebnisse dieser Verfahren unbefriedigend waren, wurden in der Folge verschiedene Zusätze mit teilweise sehr gutem Erfolg erprobt; WILCOX (1960), LAKE (1960) und SEXTON (1977) verwendeten Kohlehydrate, HOFKINS (1960), WILCOX (1960) sowie YAMANE und Mitarbeiter (1966) Eidotter, VAN WAMBEKE (1967) Milch, FEWLESS und Mitarbeiter (1975) sowie TERADA und Mitarbeiter (1978) Blutplasma, TERADA und WATANABE (1976) sowie ASHIZAWA und OKAUCHI (1984) Samenplasma. LEHRER und SCHINDLER (1969), ASHIZAWA und Mitarbeiter (1976) sowie ASHIZAWA und NISHIYAMA (1983a) setzten dem Sperma sogar Zellkulturen aus den Uterovaginaldrüsen der Hennen zu. Seit der Analyse des Samenplasmas und Ermittlung der Plasma-inhaltsstoffe durch LAKE und McINDOE (1959) wird Natriumglutamat von vielen Autoren weltweit als wesentlicher Bestandteil der Geflügelspermaverdünner verwendet.

Soll das verdünnte Sperma bis zur Insemination mehr als eine Stunde gelagert werden, so spielt die Pufferkapazität des Verdünnungsmediums eine wesentliche Rolle, denn zur Aufrechterhaltung der Befruchtungsfähigkeit sollte der pH-Wert im Bereich zwischen 6,8 und 7,1 konstant gehalten werden (BOGDANOFF u. SHAFFNER, 1954; LAKE u. RAVIE, 1979).

Die Verdünnungsrate der Ejakulate hat ebenfalls einen Einfluß auf die Befruchtungsergebnisse. MUNRO (1938) stellte fest, daß bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:3 (Samen : Verdünner) ein Abfall der Befruchtungsfähigkeit erfolgte, der bis zu einem Verdünnungsgrad von 1:64 unverändert blieb,

wenn die Zahl der inseminierten Spermien konstant gehalten wurde, d.h. die Inseminationsmenge vergrößert wurde. Über die optimale Verdünnungsrate des Spermas werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. Sie liegen bei den meisten Autoren im Bereich von 1:2 bis 1:4 (WILCOX u. CLARK, 1962; SEXTON, 1977; LAKE u. RAVIE, 1979).

Als optimale Lagerungstemperatur der Samenportionen werden in Abhängigkeit von den Konservierungsverfahren +2°C bei VAN WAMBEKE (1967), +5°C bei SEXTON und FEWLESS (1978) und LAKE (1978), +24°C bei McDANIEL (1976) und bei ASHIZAWA und Mitarbeitern (1976) sogar +41°C beschrieben. VAN WAMBEKE (1967) sowie LAKE und RAVIE (1979) wiesen darauf hin, daß bei einer Lagerungsdauer der Spermien von 24 Stunden eine Abkühlung auf +5°C bis +2°C unerläßlich ist. WISHARDT berichtete 1981 sogar über die Erhaltung der Befruchtungsfähigkeit über 48 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von +5°C, wenn das Sperma unter aeroben Bedingungen gelagert wurde. Dabei muß auf eine vorsichtige Abkühlung geachtet werden, da bei einer Schockkühlung die Anzahl der morphologisch abnormen, vor allem der sogenannten "halsgeknickten" Spermien deutlich ansteigt (SAEKI, 1960; YAMANE, 1972; TSUKUNAGA, 1972). HAMMERSTEDT und Mitarbeiter (1978) sowie SEXTON (1983) halten dagegen eine schnelle Abkühlung ohne Schädigung der Spermien und ohne Abfall der Befruchtungsergebnisse für möglich. Obwohl Hahnensperma bei normaler Körpertemperatur (+41°C) bereits nach zweistündiger Lagerung seine Befruchtungsfähigkeit nahezu vollständig verliert (SCHINDLER u. Mitarb., 1955), kann es bei diesen Temperaturen sogar bis zu vier Tagen gelagert werden, wenn es in ein Medium gebracht wird, das Zellen aus dem Genitaltrakt der Henne (ASHIZAWA u. Mitarb., 1976) bzw. kultivierte Nieren- oder Skelettmuskelzellen (ASHIZAWA u. NISHIYAMA, 1977) enthält. Gleiches gilt auch für eine Aufbewahrung der Samenverdünnung in einer Diffusionskammer (ASHIZAWA u. NISHIYAMA, 1983b). Als Nachteil dieser Verfahren ist nach Meinung der

Autoren der hohe Zeit- und Laboraufwand und die damit verbundenen Kosten zu nennen.

Als optimale Spermienanzahl in der Besamungsportion werden von GROVE und TIEFENBACH (1961) sowie WILSON und Mitarbeitern (1979) ca. 100 Millionen Spermien angesehen. SEXTON (1977) empfahl sogar nur eine Dosis von 20 Millionen Spermien, mit der er sehr gute Befruchtungsergebnisse erzielen konnte. LAKE und STEWART (1978b) halten eine Portion von 0,03 ml mit Spermienzahlen von 105 bis 150 Millionen für erforderlich. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf ein gleichbleibend gutes Befruchtungsergebnis bei einer Insemination pro Woche. Bei Mastlinien werden allgemein größere Besamungsvolumina mit über 150 Millionen Spermien pro Henne verwendet (SEXTON u. FEWLESS, 1977; VAN WAMBEKE, 1979).

Obwohl viele Jahre lang versucht wurde, die Flüssigkonservierung für 6-24 Stunden in der Praxis als gängiges Verfahren zu etablieren, gelang es erst VAN WAMBEKE (1967) Sperma zu konservieren, das nach 24stündiger Lagerung ähnlich gute Befruchtungserfolge erzielte wie natives Sperma. Die über Lagerungszeiten, -temperaturen und Befruchtungsergebnisse in der Literatur gemachten Angaben sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Literaturangaben über Befruchtungserfolge bei Kurzzeitkonservierung

Konservierungszeit (Stunden)	Temperatur (°C)	Befruchtungsrate (%)	Autoren
24	2	93	VAN WAMBEKE (1967)
24	2	93,5	VAN WAMBEKE (1972)
24	4-8	94,3	PINGEL und REIMSCHÜSSEL (1975)
96	41	85-90	ASHIZAWA und Mitarbeiter (1977)
24	5	82-91	SEXTON (1977)
24	5	76	SEXTON und FEWLESS (1978)
24	5	87	LAKE und RAVIE (1979)
48	5	93	WISHARDT (1981)
24	2-5	92,4	SCHRAMM (1982)
6	41	85,6	HOWARTH Jr. (1983)
72	41	70	ASHIZAWA und NISHIYAMA (1983a)

2.6 Konservierung von Hahnensperma bei tiefen Temperaturen

Der italienische Priester und Professor für Naturgeschichte Abbé LAZZARO SPALLANZANI (1776) berichtete als erster über die Einfrierbarkeit von Spermien. Er bemerkte, daß die Spermien ("Vermiculi") eines Hengstes bewegungslos wurden, nachdem er das Glas, in dem sie sich befanden, im Schnee abkühlte. Als er das Glas nach einer Stunde wieder aus dem Schnee herausnahm und der warmen Luft aussetzte, sah er, daß sich die Spermien "wieder belebten" (MANN u. LUTWAK-

MANN, 1981). Diese Erkenntnis wurde erst in unserem Jahrhundert für die Entwicklung von Techniken zur Fortpflanzungsbiologie genutzt.

Die Bedeutung der Langzeitlagerung von Geflügelsperma liegt vor allem im Bereich der Geflügelzucht. Dadurch wird eine Kosteneinsparung bei der Erhaltung besonders wertvoller Zuchtlinien und bei besonderen Zuchtprogrammen möglich. Die Anlage von Samenbanken von männlichen Tieren mit besonderen Eigenschaften würde verhindern, daß bestimmte Rassen oder Linien aussterben.

Vor der Entdeckung des Glycerins als Gefrierschutzmedium durch POLGE und Mitarbeiter (1949) waren alle Tiefgefrierversuche mit Hahnensperma erfolglos. Weder WINBERG (1941) noch SHAFFNER und Mitarbeiter (1941) gelangen Besamungserfolge mit tiefgefrorenem Sperma nach dem Auftauen, da nur noch eine ganz geringe Spermienbewegung zu beobachten war. Bessere Ergebnisse konnte SHAFFNER (1942) dann aufweisen, als er nach Tiefgefrierung auf -79°C noch nach 14 Monaten Aufbewahrungszeit Spermienbewegung beobachten konnte. Es gelangen ihm mit so gelagertem Sperma bei 48 Eiern 12 Befruchtungen, die embryonale Entwicklung in den befruchteten Eiern dauerte jedoch nur 10-15 Stunden.

Nach MANN und LUTWAK-MANN (1981) ist ein erfolgreiches Einfrieren der Spermien unmöglich, wenn nicht Substanzen zugesetzt werden, die vor den Gefrierschäden, insbesondere den Membranschäden schützen. RAVIE und LAKE (1982) nennen zwei Haupteffekte, die den Zelltod bewirken können. Zum einen wird der Zelle durch das Gefrieren Wasser entzogen, andererseits erzeugen insbesondere schnelle Einfriergeschwindigkeiten intrazelluläre Eisbildungen, die zur Zerstörung zellulärer Strukturen führen können. Deshalb weisen Autoren wie WATANABE (1967), LADA-GORZOWSKA und KRAWCZYK (1975) sowie MITCHELL und BUCKLAND (1976b) bei der Tiefgefrierung von Hahnensperma auf die Notwendigkeit hin, das Einfrieren nicht schneller als mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ vorzunehmen.

2.7 Gefrierschutzsubstanzen

Nach ROWE (1966) und MERYMAN (1971) kann man die kryoprotektiven Substanzen nach ihrer Penetrationsfähigkeit in verschiedene Gruppen einteilen. Zu den penetrierenden Substanzen, denen eine intrazelluläre Wirkung zugeschrieben wird, zählen vor allem Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glykole mit unterschiedlichen Substituierungen. Als extrazelluläre, d.h. nichtpenetrierende Schutzstoffe werden besonders erwähnt: Polyvinylpyrrolidon (PVP), Saccharose, Laktose, Glukose, Mannitol und Sorbitol.

Der Haupteffekt der Tiefgefrierschädigung liegt am Akrosom der Samenzelle (IYPE u. Mitarb., 1963), in der Schwellung und eventuell sogar der gesamten Ablösung (MAEDA u. Mitarb., 1984) und bei Geflügelspermien daneben auch am Halsstück, bei dem Membranablösungen und Einknickungen beobachtet werden (MAEDA u. Mitarb., 1980; TERADA u. Mitarb., 1983a; TERADA u. Mitarb., 1983b). Die zuletzt genannten Schäden haben hauptsächlich Auswirkungen auf die Motilität der Spermien, jedoch scheint ein Teil dieser Strukturzerstörungen reversibel zu sein. Der Schutz des Spermienakrosoms ist bei der Tiefgefrierkonservierung sehr wichtig, da von HOWARTH und DIGBY (1972) sowie WESTFALL und HARRIS (1974) als Ursache für den Rückgang der Befruchtungsfähigkeit von Hahnenspermien nach der Tiefgefrierung ein Verlust an Kopfkappenenzymen vermutet wird, die für die Penetration in die Eizelle notwendig sind.

Die Zugabe der Kryoprotektiva Glycerin und DMSO schützen das Akrosom der Samenzelle des Bullen während des Gefrierprozesses, aber sie schützen nicht ausreichend die Zerstörung der Ultrastruktur der Geflügelspermien (HARRIS u. Mitarb., 1973). Zerstörungen dieser Zellen reichen von leichten Schwellungen der Zelle bis zum totalen Verlust der Zytoplasmamembran (HARRIS u. Mitarb., 1973; BAKST u. SEXTON, 1979). Das Ausmaß solcher Zellschädigungen ist über die Messung der

GOT-Aktivität im extrazellulären Medium festzustellen (MA-TSUMOTO u. Mitarb., 1985).

2.7.1 Erfahrungen mit Glycerin

Die Gefrierschutzwirkung des Glycerins wurde erstmals von POLGE und Mitarbeitern (1949) beschrieben. Sie verdünnten Hahnen-, Kaninchen- und Menschengesperma mit einer glycerinhaltigen Ringerlösung im Verhältnis 1+1 und froren die Samenverdünnungen in 20 Minuten bei -79°C ein. Die Spermienmotilität war nach dem Einfrieren, vor allem beim Hahnensperma, gegenüber den Kontrollgruppen unverändert. Als Glycerinendkonzentration sollte nach Autorenangaben 10% nicht überschritten werden. PARKES (1951) konnte nach Lagerungszeiten von 10 Wochen bzw. nach 5 Monaten noch bewegliche Spermien beobachten.

Erste erfolgreiche Besamungsergebnisse konnten SMITH und POLGE (1950) mit gefrierkonserviertem Hahnensperma erzielen. Allerdings schlüpfen nur drei Küken aus 600 bebrüteten Eiern. Die Autoren wiesen darauf hin, daß das Glycerin zum Schutz der Spermien beim Tiefgefrierprozeß unbedingt notwendig sei, daß aber nach dem Auftauen durch Glycerin auch ein Verlust bzw. eine Beeinträchtigung der Befruchtungsfähigkeit erfolgt. Bei einer Glycerinendkonzentration von 15%, schneller Abkühlung auf -79°C und einer Aufbewahrungszeit von 30-60 Minuten bei dieser Temperatur erzielte POLGE (1951a) ein Befruchtungsergebnis von 54%, wenn nach dem Auftauen des Spermas durch eine zweistündige Dialyse gegen Ringerlösung das Glycerin aus der Spermaverdünnung entfernt und zur Insemination die doppelte der sonst üblichen Spermienzahl verwendet wurde. Selbst nach dreitätiger Lagerung des Spermas konnten noch Eier befruchtet werden. Die Entfernung des Glycerins war nach Auffassung des Autors notwendig, da der Verlust der Befruchtungsfähigkeit durch einen zu raschen

osmotisch schädigenden Glycerinentzug in der Vagina erfolgte. Auch wies POLGE (1951b) darauf hin, daß bessere Befruchtungsergebnisse zu erzielen sind, wenn das Hahnensperma nicht schnell sondern langsam in 15 Minuten auf -79°C eingefroren wird.

ALLEN und BOBR (1955) verdünnten Hahnensperma mit einer Tyrodelösung und setzten 15% Glycerin hinzu. Sie erreichten bei intrauteriner Besamung ein Befruchtungsergebnis von 25%. Daraus folgerten sie, daß Glycerin nach dem Auftauen die Lebenskraft der Spermien herabsetzt und daher nicht genug befruchtungsfähige Spermien den Uterus erreichen. Das erzielte Befruchtungsergebnis wurde aber dadurch geschmälert, daß die überwiegende Anzahl der Embryonen innerhalb der ersten 48 Bebrütungsstunden abstarben (ALLEN, 1958).

CLARK und SHAFFNER (1960) verwendeten den von WILCOX (1958a) beschriebenen Natrium-Posphat-Verdüner und stellten fest, daß die Spermienmotilität schon vor dem Einfrieren abnimmt, wenn Glycerin in einer Konzentration von 2% und mehr zugesetzt wird. Die beste Schutzwirkung gegen die schädigende Wirkung des Einfrierprozesses wurde allerdings bei einer Glycerinendkonzentration von 7,5-8,5% erzielt. Das Glycerin sollte nach dem Auftauen durch Zentrifugation bzw. Waschen entfernt werden, wobei bei einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 1200 g über eine Dauer von sieben Minuten ein besseres Ergebnis erzielt wurde als nach Zentrifugation über zehn Minuten. SHAFFNER (1964) hielt eine Endkonzentration von 8% Glycerin zum Schutz der Spermien für unbedingt notwendig. Da eine Entfernung des Glycerins nach dem Auftauen zu einem besseren Befruchtungsergebnis führte, verglich er die Wirkung von Dialyse und Zentrifugation der Samenverdünnung nach dem Auftauen miteinander. Mit intravaginalen Besamungen erzielte er nach Zentrifugation ein Befruchtungsergebnis von 40%, während nach der Dialyse keine Befruchtungen erfolgten.

Die Entfernung des Glycerins versuchten BROWN und Mitar-

beiter (1963) durch die intraperitoneale Besamung zu umgehen. Unter Verwendung eines glycerinhaltigen Natrium-Citrat-Verdünners waren die Befruchtungsergebnisse bei intraperitonealer Besamung schlechter als nach intrauteriner Besamung. WATANABE (1967) verwendete einen Glucose-Eidotter-Verdünnern und erzielte Befruchtungsraten von 25-29% nach einer Glycerinäquibrierungszeit von 60 Minuten bei +5°C und einer 7%igen Glycerinendkonzentration. Dieses Ergebnis konnten WATANABE und Mitarbeiter (1970) mit intrauteriner Besamung auf 66% steigern.

NEVILLE und Mitarbeiter (1971) wiesen nach, daß nach Verdünnung des Spermas mit einem Verdünnern mit Glycerinkonzentrationen von 3% und mehr im Verhältnis 1:2 keine Befruchtungen zu erzielen sind. Bei einer Konzentration von 1 oder 2% Glycerin und gleichem Verdünnungsverhältnis betrug das Befruchtungsergebnis 48 bzw. 47%, d.h. es war nur noch halb so groß wie mit nativem Sperma.

Mit zwei Jahre gelagertem Sperma, verdünnt mit einem Glucose-Eidotter-Verdünnern, konnte WATANABE (1972) bei intrauteriner Besamung ein Befruchtungsergebnis von 62,7% erzielen. Die Glycerinendkonzentration betrug 7%, und es wurden Besamungsportionen mit einem Volumen von 0,18 ml inseminiert. Im Jahre 1977 verwendeten WATANABE und TERADA Sperma, das fünf Jahre gelagert worden war, und erzielten mit der gleichen Methode ein Befruchtungsergebnis von 53%, mit neun Jahre gelagertem Sperma lag die Befruchtungsrate immer noch bei 47% (WATANABE u. TERADA, 1980a).

Der Zusatz von Glycerin, auch in hohen Konzentrationen, schützt die Spermien im Gefrierprozeß nach HARRIS und Mitarbeitern (1973) nicht vor morphologischen Schädigungen. Diese Schäden bestehen danach in:

- a) Zerstörung der Zellmembranen, vor allem in Akrosomnähe,
- b) Austritt des Inhaltes der Akrosomkappe in das Samenplasma,
- c) Verlust der Mitochondrien im Mittelstück.

Nach WESTFALL und HOWARTH (1976) fällt die Befruchtungs-

fähigkeit des Spermas signifikant ab, wenn eine 15% glycerinhaltige KREBS-Ringer-Lösung gleichzeitig mit dem Sperma inseminiert wird, bzw. fünf Minuten vor oder nach der Insemination appliziert wird. Die Autoren vermuten, daß Glycerin den Spermatransport von der Vagina zu den Speicherdrüsen behindert. Dieselben Autoren wiesen darauf hin, daß das Glycerin offenbar nur in der Vagina seine schädigende Wirkung auf das Sperma ausübt (WESTFALL u. HOWARTH, 1977a). Nach ihrer Meinung gelangen die Spermien 10-15 Minuten nach der Insemination in den Uterus und entgehen somit dem Einfluß des Glycerins.

MASUDA und Mitarbeiter (1974) untersuchten die Wirkung verschiedener Kryoprotektiva vergleichend. Sie erreichten unter Verwendung von Glycerinzusätzen die besten Konservierungs- und Befruchtungsergebnisse. Äthylenglycol, Propylenglycol und auch DMSO waren dem Glycerin in ihrer Gefrierschutzwirkung weit unterlegen. Das Befruchtungsergebnis lag bei Verwendung von Glycerin bei 56,1%. Sie erreichten dies bei einer Glycerinendkonzentration von 7%, und es wurde zur Verdünnung des Spermas ein Milch-Glucose-Natriumtetrat-Verdünnern verwendet, dessen osmotischer Druck bei 350 mOsm/Kg H_2O lag. Hinweise über die verwendete Besamungstechnik und über die Größe der Besamungsvolumina gaben die Autoren nicht.

MITCHELL und Mitarbeiter (1975) verglichen die intravaginale und intrauterine Besamungstechnik, wobei sie bei Anwendung der intrauterinen Technik ein Befruchtungsergebnis von 33,1% erzielten, während bei intravaginaler Besamung nur 13,3% der Eier befruchtet wurden. Die Einfriergeschwindigkeit des Spermas betrug 7,2°C/Minute und das Auftauen der Besamungsportionen erfolgte im Eisbad. MITCHELL und BUCKLAND (1976a) verwendeten den von LAKE (1968) entwickelten Natriumglutaminat-Verdünnern mit einer Glycerinendkonzentration von 8%. Die Glycerineleminierung aus der Samenverdünnung vor der Insemination erfolgte durch Zentrifugation mit einer

Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 1466 g über die Dauer von 10 Minuten. Bei intravaginaler Besamung und bei einem Besamungsvolumen von 0,1 ml/Henne konnte nur ein Befruchtungsergebnis von ca. 20% erreicht werden. MITCHELL und Mitarbeiter(1977) sowie SCOTT und Mitarbeiter (1977) entfernten das Glycerin nach dem Auftauen durch Zentrifugation mit einer RZB von 500 g über eine Dauer von 10 Minuten. Bei 2-3 cm tiefer intravaginaler Besamung erhielten sie Ergebnisse, die zwischen 15 und 22% lagen. Die Autoren wiesen aber darauf hin, daß durch eine Selektion der Hähne eine Verbesserung der Befruchtungsergebnisse erreichbar sei.

Ebenfalls mit dem Verdünner nach LAKE (1968) erzielten LADA-GORZOWSKA und PODGORNÝ (1976) lediglich Befruchtungsergebnisse von 6,5-19,1%, wenn das Glycerin vor der Insemination durch Zentrifugieren bei einer RZB von 700 g über eine Zeit von 15 Minuten entfernt worden war. Bei Anwendung der von LAKE (1974) beschriebenen tiefen intravaginalen Besamungstechnik konnten LADA-GORZOWSKA und Mitarbeiter (1978) das Befruchtungsergebnis auf 56,7% steigern, und im Jahre 1979 verglichen LADA-GORZOWSKA und Mitarbeiter mit dieser Besamungstechnik die Befruchtungsergebnisse bei reinen Lege- und Mastlinien. Die Besamungsportionen enthielten 0,25 ml verdünntes Sperma, wobei aber über die genaue Anzahl der Spermien pro Portion keine Angaben gemacht wurden. Die Autoren stellten fest, daß Legehennenpopulationen bessere Befruchtungen aufwiesen als Mastlinien. Bei beiden Linien konnte aber nur eine durchschnittliche Befruchtungspersistenz von vier Tagen festgestellt werden. Die Befruchtungsergebnisse betrachteten sie als recht zufriedenstellend, sie lagen bei den Mastlinien bei 44% und bei den Legehennen sogar bei 63%.

Über Befruchtungsergebnisse von 88% mit Tiefgefriersperma und intravaginaler Besamung berichteten LAKE und STEWART (1978a). Sie bezogen sich dabei im wesentlichen auf die von LAKE (1968) vorgeschlagene Konservierungsmethode, die damals

noch nicht den erhofften Erfolg gebracht hatte. Die Autoren stellten jedoch klar, daß die jetzigen Ergebnisse nur erreichbar waren, weil die Hähne auf Eignung ihres Spermas für die Tiefgefrierung selektiert worden waren. Das Sperma wurde in Glasampullen eingefroren (0,15 ml Sperma und 0,45 ml glycerinhaltiger Verdünner). Folgende Punkte stellten sie als besonders wichtig heraus:

1. Verwendung von Glycerin als Kryoprotektivum in einer Endkonzentration von 8%.
2. Verdünnungsrate 1:4.
3. Die Einfriergeschwindigkeit bis -35°C muß bei $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ liegen.
4. Die Auftautemperatur darf $+5^{\circ}\text{C}$ nicht überschreiten, und als Auftaulösung muß ein spezieller glycerinfreier Verdünner zugesetzt werden.
5. Die Entfernung des Glycerins muß durch Zentrifugation bei $+5^{\circ}\text{C}$ erfolgen, wobei eine RZB von 700 g über eine Zeit von 15 Minuten angewendet werden soll.
6. Eine tiefe intravaginale Besamung ist wegen der durch den Gefrierprozeß entstandenen Spermienschäden unbedingt erforderlich, wobei die Verwendung des Spermas spätestens 15 Minuten nach der Glycerinentfernung erfolgen sollte.

Die Glycerinkonzentration muß nach LAKE und Mitarbeitern (1980) vor der Insemination auf unter 1,2% gesenkt werden. Sie empfehlen dazu ein aufwendiges Verfahren, wobei während der Auftauphase ein glycerinfreier Verdünner in 2-3 Minutenintervallen schrittweise zugesetzt wird und dem Ampulleninhalt von 0,6 ml insgesamt 3,6 ml Verdünner zugegeben werden. Dann erst soll die Zentrifugation erfolgen. LAKE und Mitarbeiter (1981) erreichten mit dieser Methode Befruchtungsraten von über 90%, wenn im Abstand von drei Tagen besamt wurde und eine Besamungsportion von über 500×10^6 Spermien in 0,15 ml Volumen pro Henne verwendet wurde. Das Sperma wurde bis zum Zeitpunkt der Insemination bei $+5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Zur Verwendung kam nur einwandfreies Sperma aus Sammelejakulaten

von Hähnen, die einem hohen Selektionsgrad unterzogen worden waren.

ETCHES und Mitarbeiter (1980) untersuchten den von LAKE (1968) beschriebenen Verdünner und verglichen ihn mit einem milchhaltigen Verdünner. Mit Hilfe des letzteren wurde ein Befruchtungsergebnis von 14% erzielt, mit dem LAKE'schen Verdünner nur von 2%.

WATANABE und TERADA (1980b) wendeten die Pelletmethode nach NAGASE und NIWA (1964) an und erreichten mit 200 μ l großen Pellets bei einer Glycerinendkonzentration von 7% und intravaginaler Besamung ein Ergebnis von 18,8%, bei intrauteriner Besamung betrug die Befruchtungsrate 85,7%. GRIMM (1981) erreichte mit gleicher Besamungstechnik ein Befruchtungsergebnis von 43% bei Verwendung von ca. 80×10^6 vorwärtsbeweglichen Spermien in der Besamungsportion. Dieses Ergebnis konnten ROHLOFF und Mitarbeiter (1983) auf über 50% steigern, indem die Zahl der inseminierten Spermien verdoppelt wurde.

ANSAH und BUCKLAND (1982a) erreichten mit der Methode nach LAKE und STEWART (1978a) nach Entfernung des Glycerins vor der Besamung durch Zentrifugation über 10 Minuten bei einer RZB von 500 g ein Befruchtungsergebnis von 19%. Wenn aber das Sperma von Hähnen eingesetzt wurde, die vorher auf Einfrierbarkeit ihrer Ejakulate selektiert worden waren, konnte das Ergebnis auf 37,3% gesteigert werden. Die Befruchtungspersistenz betrug durchschnittlich 2,4 Tage; bei den selektierten Hähnen aber 4,8 Tage. Sie schlossen daraus, daß durch Selektion über die Verlängerung der Befruchtungspersistenz eine Erhöhung des Befruchtungsergebnisses erfolgt war. Durch Selektion der Hähne erhöhten auch YOUSIF und Mitarbeiter (1984) ihre Ergebnisse von 20% auf 40% bei Insemination von 230×10^6 Spermien pro Henne. Beim Vergleich mehrerer Verdünner stellten sie fest, daß die positive Wirkung der Selektion für alle Verdünner gleichermaßen gilt.

WISHART (1984) erreichte Befruchtungsergebnisse von ca.

60%, wenn $100-200 \times 10^6$ Spermien pro Henne inseminiert wurden. RAVIE und LAKE (1984) verglichen die Konfektionierung in Ampullen und Pailletten miteinander, wobei sie mit Pailletten keine besseren Ergebnisse erzielen konnten als mit Ampullensperma. Bei Verwendung von mittleren Pailletten (0,5 ml) erhielten sie ein Befruchtungsergebnis von 75,8% und mit 0,6 ml-Ampullen ein Ergebnis von 81%.

2.7.2 Erfahrungen mit Dimethylsulfoxid (DMSO)

Um die negativen Effekte zu vermeiden, die durch hohe Glycerinkonzentrationen in den Samenverdünnungen verursacht werden, wurde schon früh nach anderen Kryoprotektiva gesucht. HARRIS (1965) versuchte seine Besamungsergebnisse durch den Einsatz des DMSO zu verbessern. Er verdünnte Hahnsperma im Verhältnis 1:3 und verwendete im Verdünner 16% DMSO, wobei nach intravaginaler Besamung 27% und nach intraperitonealer Besamung 44% der Eier befruchtet wurden. Durch Zusatz von Eidotter und PVP zum Verdünner konnte HARRIS (1968) seine Ergebnisse, allerdings nur bei intraperitonealer Besamung, auf 77% steigern.

SEXTON testete 1972 den Zusatz verschiedener Kryoprotektiva zu gewaschenem Hahnsperma und stellte fest, daß die Spermienmotilität bei einer Endkonzentration von 4-8% DMSO für mindestens 15 Minuten erhalten blieb. Die Besamungen waren aber wenig erfolgreich. KURBATOV und Mitarbeiter (1973) setzten Frischsperma 14% DMSO hinzu und erhielten hiermit Befruchtungsraten von 73,7%. Nach dem Einfrieren des Spermas in Pelletform waren die Befruchtungen auf 29,8% reduziert. MITCHELL und BUCKLAND (1976b) versuchten mit Hilfe von DMSO eine andere Einfriertechnik zu entwickeln. Sie stellten dabei fest, daß weder die Einfriergeschwindigkeit, die Äquilibrierungszeit noch die DMSO-Konzentration einen signifikanten Einfluß auf die Befruchtungsraten haben.

Die Befruchtungsergebnisse lagen zwischen 13,1-26,6%, allerdings nur bei Anwendung der komplizierten intrauterinen Besamungstechnik. Sie schlossen aus diesen Ergebnissen, daß DMSO unter den geprüften Bedingungen kein geeignetes Kryoprotektivum für das Einfrieren von Hahnenspermien sei. SCHRAMM und LÖHLE (1976) verglichen die DMSO-Wirkung mit Glycerin und Äthylenglycol und stellten durch Bestimmung der Motilität, der Anzahl der morphologisch veränderten Spermien sowie der Methylenblaureduktionszeit fest, daß DMSO dem Glycerin erheblich unterlegen ist. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch GRIMM (1981), der bei Verwendung des von SCHRAMM und Löhle (1976) beschriebenen Glutaminatverdünners bei Glycerinzusätzen von 8% Befruchtungsergebnisse von 43% erzielte gegenüber Befruchtungsraten von 15%, die mit DMSO-haltigen Samenverdünnungen (8%ig) erzielt werden konnten.

Bei dem von SEXTON (1976b) vorgestellten Verfahren zur Langzeitkonservierung von Hahnensperma, wird eine DMSO-Endkonzentration von 4% vorgeschlagen. Als Verdünner wurde der Beltsville-Poultry-Semen-Extender (BPSE) verwendet bei einer Verdünnungsrate von 1:4. Nach Abkühlung auf +5°C wurde die Samenverdünnung zwei Stunden gelagert; dann wurde DMSO hinzugegeben und eine Äquilibrationszeit von zwei Stunden eingehalten. Nach Abfüllung in 0,7 ml-Ampullen erfolgte die Einfrierung mit einer Geschwindigkeit von 1,1°C/Minute bis eine Temperatur von -20°C erreicht war. Die Ampullen wurden drei Minuten im Stickstoffdampf belassen und anschließend in den flüssigen Stickstoff getaucht. SEXTON und Mitarbeiter (1978) verglichen diese Methode mit der Methode von LAKE und STEWART (1978a), wobei aber das Glycerin bei einer RZB von 1466 g über 10 Minuten vor der Besamung entfernt wurde. Bei Insemination von 135×10^6 Spermien pro Henne wurde mit DMSO-haltigen Portionen ein Besamungsergebnis von 25,2% erreicht und mit Portionen, denen das Glycerin entzogen worden war, nur ein Ergebnis von 10,5%. Bei Steigerung der Dosis auf 150×10^6 Spermien pro Henne konnte SEXTON (1980) mit DMSO-

haltigen Portionen sogar eine Befruchtungsrate von 47% erzielen. Dabei sollte der Einfriervorgang zweistufig erfolgen.

SEXTON (1981a) stellte in mehreren Versuchen fest, daß die optimale Endkonzentration von DMSO bei 4% liegt, die Äquilibrierungszeit sollte 1-2 Stunden betragen. Die günstigsten Verdünnungsraten lagen bei 1:3 bis 1:5. Mit 75×10^6 Spermien pro Besamungsportion wurden nur Befruchtungsergebnisse von 22-26% erzielt, optimale Befruchtungsergebnisse waren mit Portionen von 100×10^6 Spermien bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 bzw. mit 300×10^6 Spermien bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:5 zu erreichen (SEXTON, 1981b).

WILLIAMSON und Mitarbeiter (1981) empfahlen DMSO der Samenverdünnung bei +15°C zuzugeben, die Samenverdünnung dann rasch auf +5°C abzukühlen und dann erst für zwei Stunden zu äquilibrieren. Die Befruchtungsergebnisse betrugen in ihren Versuchen 42-71%.

DUPLAIX und SEXTON erreichten 1983 bei Inseminationen mit 300×10^6 Spermien pro Henne mit 51% die besten Ergebnisse. In diesen Versuchen wurden die Eier allerdings nur für die Zeit vom 2.-4. Tag nach einmaliger Insemination gesammelt. Im Jahre 1984 verglichen sie verschiedene Paillettengrößen miteinander und konnten aber in den Besamungsergebnissen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Für Paillettengrößen von 0,5 ml und 1,0 ml konnten sie mit einer Gesamtspermienzahl von 300×10^6 Spermien pro Henne Befruchtungsergebnisse von 45-48% erreichen.

2.7.3 Erfahrungen mit anderen Kryoprotektiva

KURBATOV und Mitarbeiter (1970) wiesen nach, daß Äthylen-glycol in einer Endkonzentration von 3,8% im frisch ver-

dünnten Samen die Befruchtungsfähigkeit des Spermas nur geringfügig herabsetzte. Gleiche Ergebnisse konnten BROWN und GRAHAM (1971) bei Verwendung von Putenfrischsperma mit Äthylenglykolkonzentrationen von 5-20% erzielen.

SEXTON (1972) stellte im Vergleich mit anderen Kryoprotektiva fest, daß auch Äthylenglycol in einer Konzentration von 4-8% dem Samen zugesetzt, keinen negativen Einfluß auf die Motilität der Spermien ausübt. Bei einem Zusatz von 12% Äthylenglycol zum frischen Samen erhielten KURBATOV und Mitarbeiter (1973) noch eine Befruchtungsrate von 49,6%. Nach dem Einfrieren lag diese Rate noch bei 31,4%. Dieses Ergebnis konnten KURBATOV und Mitarbeiter (1976) auf 45,9-59,1% bei Verwendung eines milchhaltigen Verdünners steigern. Sie beschrieben, daß es erhebliche Unterschiede in der Einfrierbarkeit der Ejakulate verschiedener Hähne gibt.

Der Einsatz von Äthylenglycol, dem nativen Sperma zugesetzt, senkte nach SCHRAMM (1975) im Gegensatz zu Glycerin und DMSO die Befruchtungsrate gegenüber originärem Sperma kaum. Nach Tiefgefrierkonservierung mit Äthylenglycol konnten noch Befruchtungsergebnisse von 10-30% erzielt werden, nachdem das Sperma über 78-236 Tage in flüssigem Stickstoff gelagert worden war. Die Endkonzentration des Äthylenglycols betrug jeweils 10% bei einem Verdünnungsverhältnis von 1+1. SCHRAMM und LÖHLE (1976) stellten fest, daß Äthylenglycol in steigenden Konzentrationen die Motilität der Spermien vermindert, daß aber die morphologischen Schäden geringer waren als beim Zusatz von Glycerin oder DMSO. Im Jahre 1978 erreichten SCHRAMM und LÖHLE mit intravaginalen Besamungen Befruchtungsraten bis zu 28%. Nach dem Auftauen wurden auch nur geringe Motilitäten der Spermien festgestellt.

BERGMANN und SCHRAMM (1979) verglichen die Spermienmorphologie nach Zusatz von Äthylenglycol, Glycerin und DMSO, wobei sie feststellten, daß mit Glycerin zwar mehr Eier befruchtet wurden, daß aber die morphologischen Schäden an den Spermien beim Zusatz von Äthylenglycol geringer sind als

bei anderen Kryoprotektiva. SCHUSTER (1980) stellte fest, daß Äthylenglycol bei der Tiefgefrierung von Hahnensperma dem Glycerin in seiner kryoprotektiven Eigenschaft unterlegen sei. GRIMM (1981) erhielt bei Verwendung von Äthylenglycol in einer Endkonzentration von 8% bzw. 12% bei intravaginaler Besamung keine befruchteten Eier.

MAC PHERSON und Mitarbeiter (1969) erzielten mit Putensperma mit einem Verdünner, der in der Endkonzentration 3,3% Dimethylacetamid (DMA) und 1,7% Glycerin enthielt, ein Befruchtungsergebnis von 9%. Wenn nach dem Auftauen eine Dialyse durchgeführt wurde, waren von den gelegten Eiern 24% befruchtet. Den Einsatz von DMA als alleiniges Kryoprotektivum für Hahnensperma empfehlen LAKE und RAVIE (1982, 1984) sowie LAKE (1984). Damit erhielten LAKE und RAVIE (1982) bei Inseminationen mit 225×10^6 Spermien pro Henne jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen 76,5% befruchtete Eier von den am 2.-6. Tag nach der ersten Besamung gelegten Eiern. Bei drei Besamungen in einer Woche (1., 4. und 7. Tag) betrug das Ergebnis nur 59% für die Zeit vom 2.-6. Tag nach erster Insemination.

Die gleichen Autoren verglichen 1984 den Einsatz dieses Kryoprotektivums mit Propandiol, wobei sie feststellten, daß vor allem mit DMA ähnlich gute Ergebnisse wie mit Glycerin zu erzielen waren, zumal das DMA vor der Insemination nicht entfernt werden mußte, und der Arbeitsaufwand mit diesem Kryoprotektivum wesentlich geringer sei. Bei Applikation von 188×10^6 Spermien pro Henne betrug das Befruchtungsergebnis bei Verwendung von DMA 69,8%, mit Propandiol konnte lediglich ein Ergebnis von 34,1% erzielt werden.

YOUSIF und Mitarbeiter verwendeten 1984 die von MAC PHERSON und Mitarbeitern (1969) für Putensperma entwickelte Kryoprotektivakombination von DMA und Glycerin und erhielten damit ein Befruchtungsergebnis von 28% und beim Einsatz selektierter Hähne sogar von 45%.

2.8 Auswirkungen der Zentrifugation auf Hahnensperma

Einer Zentrifugation werden die Spermien im allgemeinen nur dann unterworfen, wenn eine Konzentrierung der Spermien notwendig ist oder wenn eine Waschung erfolgen soll. Eine solche Waschung empfahl LAKE (1956) für Hahnensperma. Über eine Verdünnung des Spermas mit anschließender Zentrifugation sollte eine Reduzierung der natürlichen Kontamination mit Urin, Kot und "transparent fluid" erfolgen und damit eine bessere Konservierung des Spermas erreicht werden. WILCOX (1958b) verwendete dazu einen Phosphat-Puffer und zentrifugierte das Sperma mit einer RZB von 600 bzw. 1200 g. Er stellte danach keinerlei Auswirkungen auf die Befruchtungsfähigkeit des Spermas fest.

Die Auswirkungen der Zentrifugation untersuchte SEXTON (1973) über eine Zeit von 10 Minuten bei einer RZB von 404 bzw. 552 g. Nach Zentrifugation des verdünnten Spermas war kein Einfluß auf das Befruchtungsvermögen der Spermien zu erkennen. Ein einmaliges Waschen des Spermas mit einem Phosphat-Puffer hatte einen stimulierenden Effekt auf das Befruchtungsergebnis. Dieses sank allerdings signifikant ab, wenn eine Wiederholung des Waschens erfolgte. Auf ein ähnliches Ergebnis wies bereits WHITE (1953) hin, der die Auswirkung der Zentrifugation auf Säugetiersperma untersucht hatte. Auch er hatte nach zweimaligem Waschen signifikant niedrigere Spermienmotilität beobachtet als wenn das Sperma nur einmal auf diese Weise behandelt wurde.

CLARK und SHAFFNER (1960) empfahlen Glycerin vor der Insemination durch Zentrifugation zu entfernen. Ein 10 Minuten langes Zentrifugieren bei einer RZB von 1200 g ergab, daß bei höherem Glyceringehalt die Beweglichkeit der Spermien durch Zentrifugation stärker reduziert wird. SHAFFNER (1964) sowie LAKE (1968) empfahlen, die Glycerinentfernung aus der Samenverdünnung vor der Besamung über die Zentrifugation vorzunehmen, da hiermit bessere Ergebnisse zu erzie-

len seien, als mit glycerinhaltigem Sperma, bzw. mit Sperma, bei dem das Glycerin durch Dialyse entfernt wurde.

WESTFALL und HOWARTH (1977b) untersuchten die Auswirkungen des Zentrifugierens des Spermas, indem sie die Spermien einer RZB von 650 g bzw. 960 g über eine Zeit von 15 Minuten aussetzten. Zunächst stellten sie fest, daß die Spermien nach Glycerinzusatz eine normale Morphologie zeigten, daß aber nach der Zentrifugation viele Spermien gekrümmt und aufgewickelt, also abnorm waren. Schon der Zusatz von Glycerin bewirkte einen Abfall der Konzentration der Kationen Mg^{++} und K^{+} . Eine Wiederherstellung der alten Konzentrationen konnte durch die Zentrifugation nicht erreicht werden, obwohl ein leichter Konzentrationsanstieg von Mg^{++} und K^{+} erfolgte. Nach WESTFALL (1978) war die GOT-Konzentration nach Glycerinzusatz im extrazellulären Bereich nicht erhöht, nach der Zentrifugation durch die Zellmembranschädigung lag aber eine erhebliche GOT-Erhöhung im extrazellulären Bereich vor.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methode

3.1.1 Tiermaterial

Als Samenspender standen 28 Hähne einer mittelschweren Population zur Verfügung, die bei Versuchsbeginn über acht Monate alt waren. Eine Selektion auf Einfrierbarkeit ihrer Ejakulate war nicht erfolgt. Als Samenempfänger wurden bis zu 180 Hennen der Rasse rote Rhodeländer verwendet.

Die Hähne wurden einzeln in geräumigen Käfigen gehalten, während sich die Hennen jeweils zu zweit in einem Käfig befanden. Ein handelsübliches Hennenalleinfutter in Pelletform sowie Wasser aus Selbsttränken stand allen Tieren ad libitum zur Verfügung. Alle verwendeten Hennen wurden vor Versuchsbeginn zu Besamungsversuchen mit Frischsperma verwendet, und alle legten in dieser Zeit befruchtete Eier.

3.1.2 Samengewinnung

Die Entsamung der Hähne erfolgte in der von BURROWS und QUINN (1935, 1937) beschriebenen und von SCHUSTER (1980) modifizierten Methode, wobei eine Hilfsperson den Hahn auf einem Tisch fixiert und mit der rechten Hand die Rückenmassage durchführt. Der Operateur komprimiert mit leichtem Druck die Kloakenregion, und der durch die Rückenmassage in die Samenleiter beförderte und aus der unteren Kommissur ablaufende Samen kann unschwer aufgefangen werden. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Verschmutzung des Spermas mit Kot oder Urin erfolgt. Nur die spermareiche Fraktion des Ejakulates, d.h. ohne die von NISHIYAMA (1951) als "transparent fluid" bezeichnete Lymphe, wird gewonnen, und zwar wird das Sperma über einen PVC-Trichter in EPPENDORF-Reaktionsgefäßen, die auf +37°C temperiert wurden, aufgefangen.

3.1.3 Beurteilung der Ejakulate

Die Untersuchung und Beurteilung der gewonnenen Ejakulate fand unmittelbar nach der Samengewinnung im Labor statt. Beurteilt wurden Volumen, Spermiendichte, sowie der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien. Die Dichtebestimmung erfolgte mit Hilfe einer Blutkörperchenzählkammer (THOMA) und die Motilitätsuntersuchung im Deckglaspräparat unter einem auf +37°C beheizten Phasenkontrastmikroskop bei 160facher Vergrößerung.

3.1.4 Verdünnung und Konservierung der Ejakulate

Um eine gleichbleibende Spermienqualität und -menge zu gewährleisten, wurden die Hähne, wie von McDANIEL und SEXTON (1977) empfohlen, während des Versuchszeitraumes dreimal wöchentlich entsamt. Nur die spermienreichen Phasen ihrer Ejakulate wurden als Mischejakulate für die Konservierung gesammelt und verwendet. Vor der Verdünnung wurden die Mischejakulate auf ihre Spermiendichte untersucht und ihr Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bestimmt. Für die Konservierung kamen folgende Verdünner zum Einsatz:

1. Saccharid-Glutaminat-Verdünner nach SCHRAMM und LÜHLE (1976) (Verdünner I)

Raffinose	6,500 g
Natrium-L-Glutaminat	1,000 g
Inosit	1,000 g
Laktose	1,000 g
Fruktose	1,000 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

2. Gepuffelter Verdünner auf Glutaminatbasis nach LAKE (1968) (Verdünner II)

Natrium-Glutaminat	1,920 g
Fruktose	0,800 g
Magnesiumacetat x 4 H ₂ O	0,070 g
Kaliumacetat	0,500 g
PVP (MG 10000)	0,300 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Als Kälteschutzsubstanz kam bei beiden Verdünnern ohne Ausnahme Glycerin zum Einsatz. Die Endkonzentration des Glycerins betrug in allen Versuchsabschnitten 8%. Die Verdünnung der Ejakulate wurde bei Zimmertemperatur vorgenommen, zur Verwendung kamen Verdünnungsraten von 1:2, 1:4 und 1:6 (Ejakulat : Verdünner). Die Abkühlung des verdünnten Samens auf +5°C wurde in einer programmierbaren Kühltruhe (RUBARTH) vorgenommen und dauerte jeweils 60 Minuten. Für die Konfektionierung der Samenverdünnungen wurde das von NAGASE und NIWA (1964) beschriebene Pelletverfahren gewählt, und die 100 µl großen Pellets wurden wie bei LAIBLIN (1974), SCHUSTER (1980) und GRIMM (1981) in beschriftete EPPENDORF-Reaktionsgefäße verbracht und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.5 Glycerinentfernung durch Zentrifugation

Das Auftauen der Samenportionen erfolgte bei einer Temperatur von +5°C in einem Zentrifugenröhrchen mit Rundboden. Zu jeweils vier Pellets wurden 0,8 ml glycerinfreier temperierter Verdünner (+5°C) gegeben. Die mit Verdünner I eingefrorenen Samenportionen wurden mit Verdünner I aufgetaut, zu den im Verdünner II konservierten Samenportionen wurde ein

speziell von LAKE und STEWART (1978a) für das Auftauen entwickelter Verdünner zugesetzt:

Natrium-Glutaminat	1,920 g
Fruktose	0,600 g
Magnesiumacetat x 4 H ₂ O	0,080 g
Kaliumcitrat	0,128 g
Natriumacetat (Anhydrat)	0,510 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Zentrifugation der Samenportionen erfolgte bei +5°C mit folgenden Zentrifugen:

1. für die Vorversuche und für den Versuchsabschnitt III
HERAEUS-Minifuge GL
2. für die Versuchsabschnitte I, II und IV
HERAEUS-Universal Junior IV KS.

Die Angaben über die Höhe der bei der Zentrifugation angewandten Zentrifugalkräfte wurden über die Nennung der Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) gemacht. Hiermit wird ausgedrückt, mit wievielfacher Erdbeschleunigung (g) die Zentrifugation durchgeführt wird.

3.1.6 Besamungstechnik

Nach dem Zentrifugieren des Spermas wurde der Überstand abpipettiert, und eine Volumenauffüllung erfolgte mit dem jeweiligen gleichen glycerinfreien Verdünner. Während dieser Arbeiten und während des Transports des Spermas bis in den Hennenstall wurde das Sperma bei ca. +5°C gehalten. Erst unmittelbar vor der Besamung erfolgte eine Erwärmung der Samenportionen auf Raumtemperatur. Besamt wurde wie bei GRIMM (1981) mit einer automatischen Dosierpistole (I.M.V.) unter Verwendung von mittleren Pailletten.

Durch die sehr genaue Dosierbarkeit war gewährleistet, daß jede Henne mit einer Samenportion von jeweils 0,2 ml, bzw. im Versuchsabschnitt I auch mit jeweils 0,1 ml Sperma-verdünnung besamt wurde. Diese Portionen entsprachen bei 0,1 ml einer Gesamtzahl von $150-180 \times 10^6$ bzw. bei 0,2 ml $300-360 \times 10^6$ Spermien pro Henne. Die Besamungen erfolgten jeweils intravaginal, und zwar nach der von LAKE (1974) beschriebenen Methode, bei der das Besamungsinstrument ca. 5-6 cm tief in die Vagina eingeführt wird. Nur bei der Verwendung von Frischsperma und im Versuchsabschnitt I erfolgte auch die sogenannte "flache" intravaginale Besamung bis zu einer Tiefe von 1-3 cm.

In allen Versuchsabschnitten wurde eine dreimalige Besamung der Hennen, und zwar am 1., 3. und am 6. Tag des Versuchszeitraums vorgenommen. Der verwendete Samen war vor der Besamung mindestens eine Woche in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Besamungen erfolgten in der Zeit von 11.00 Uhr bis 15.00 Uhr. Für beide Besamungsmethoden wurden die Hennen aus dem Käfig genommen, eine Hilfsperson ergriff die Ständer der Henne mit einer Hand und fixierte das Tier mit dem Kopf nach unten und mit dem Rücken gegen den Körper, so daß die Kloake dem Operateur zugewendet war. Mit der anderen Hand wurde das Abdomen der Henne so komprimiert, daß die Vagina vorgelagert wurde und das Besamungsinstrument leicht eingeführt werden konnte.

3.1.7 Versuchsanordnung

In Vorversuchen sollte ermittelt werden, welche Bedingungen für die Zentrifugation der Hahnenspermien am geeignetsten sind. Bei Anwendung unterschiedlicher Relativer Zentrifugalbeschleunigungen (RZB) über Zeiten von 10, 15 und 20 Minuten und Verdünnungsstufen von 1:2, 1:4 und 1:6 wurden die Vergleiche angestellt.

Im Versuchsabschnitt I wurde ein Vergleich zwischen flacher und tiefer intravaginaler Besamung angestellt und gleichzeitig wurde mit zwei unterschiedlich großen Besamungsportionen gearbeitet. Verwendung fand der Verdünner I, wobei eine Verdünnungsstufe von 1:2 benutzt wurde. Folgende Besamungsportionen wurden jeweils bei flacher und tiefer Besamung inseminiert:

1. ca. 180×10^6 Spermien in 0,1 ml,
2. ca. 360×10^6 Spermien in 0,2 ml.

Die Entfernung des Glycerins erfolgte durch Zentrifugation bei einer Temperatur von +5°C über 15 Minuten bei einer RZB von 730 g.

Im Versuchsabschnitt II wurde ebenfalls nur der Verdünner nach SCHRAMM und LÖHLE (1976) verwendet. Die Besamungsportion betrug in 0,2 ml zwischen 300×10^6 und 360×10^6 Spermien pro Henne. Die Zentrifugation zwecks Glycerinentfernung erfolgte bei einer RZB von 280 g bzw. von 730 g. Die Verdünnung der eingefrorenen Portionen war im Verhältnis von 1:2, 1:4 und 1:6 (Samen : Verdünner) erfolgt.

In den Versuchsabschnitten III und IV betrug das Verdünnungsverhältnis jeweils 1:2. Als Verdünner kamen der Verdünner nach SCHRAMM und LÖHLE (1976) sowie die Verdünnerkombination nach LAKE (1968) und LAKE und STEWART (1978a) zum Einsatz.

Im Versuchsabschnitt III erfolgte der Vergleich der Glycerinentfernung durch Zentrifugation über 15 Minuten, wobei Relative Zentrifugalbeschleunigungen von 280 g, 440 g, 540 g, 670 g, 820 g, 940 g, 1060 g und 1250 g getestet wurden. Die Samenproben wurden bei +5°C zentrifugiert, und nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Auffüllung zum alten Volumen mit dem entsprechenden glycerinfreien Verdünner. Die Proben wurden danach bei Zimmertemperatur gehalten, und die Spermienmotilität nach dem Zentrifugieren bis zu 60 Minuten in Abständen von jeweils 10 Minuten überprüft.

Im Versuchsabschnitt IV erfolgte die Entfernung des Glycerins wiederum durch Zentrifugation über 15 Minuten. Dieser Versuchsabschnitt wurde aus technischen Gründen in vier Abschnitte unterteilt, wobei in den vier Teilabschnitten folgende RZB zur Anwendung kamen:

1. 280 g und 820 g
2. 440 g und 920 g
3. 550 g und 1080 g
4. 680 g und 1250 g

Die Besamungsportion pro Henne enthielt bei 0,2 ml Volumen ca. 360×10^6 Spermien.

Es kamen in allen vier Teilabschnitten auch Samenportionen zur Insemination, die sowohl mit dem Verdünner I wie auch mit dem Verdünner II verdünnt und eingefroren worden waren und aus denen das Glycerin nicht entfernt worden war. Als Kontrolle wurde eine Hennengruppe mit Frischsperma, dem im Verhältnis von 1:2 ein glycerinhaltiger Verdünner zugesetzt worden war, besamt.

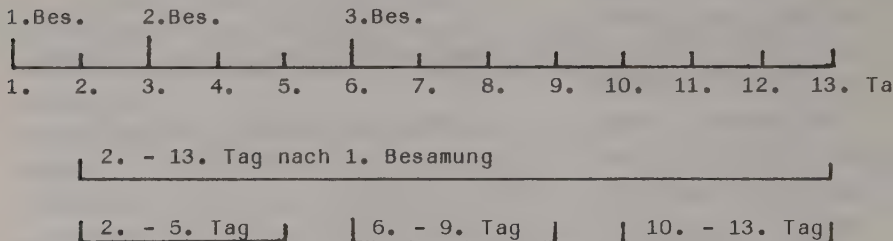
In den Versuchsabschnitten I, II und IV wurde als Kontrolle jeweils eine Hennengruppe mit unverdünntem Frischsperma besamt, auch wurden jeweils zwei Hennengruppen mit Frischsperma besamt, das mit Verdünner I und mit Verdünner II im Verhältnis von 1:2 verdünnt worden war.

Bei allen durchgeführten Besamungen mit Tiefgefriersperma vergingen zwischen der Zentrifugation und der Insemination maximal 30 Minuten. Die Besamungen mit Frischsperma erfolgten ca. 60 Minuten nach der Samengewinnung.

3.1.8 Versuchsauswertung

Die Beurteilung des Einflusses der Zentrifugation erfolgte durch die Ermittlung der Spermienmotilität unmittelbar nach der Zentrifugation über 60 Minuten in Abständen von jeweils 10 Minuten.

Für die Besamungsversuche wurden Gruppen von zwölf Hennen zusammengestellt. Die Auswertung erfolgte durch Angabe des Prozentsatzes an befruchteten Eiern nach 14-tägiger Inkubation. Die Eier wurden für die Zeit vom 2.-13. Tag nach der ersten Besamung gesammelt, bei +15°C gelagert und am 13. Tag in den Brutschrank gelegt. Das folgende Schema gibt einen Überblick über die Anordnung der Besamung und den Zeitraum der Eisammlung:



Bewertet wurde das Befruchtungsergebnis für die Zeit vom 2.-13. Tag nach der ersten Besamung. Daneben erfolgte eine Unterteilung des Versuchszeitraumes in drei zeitgleiche Abschnitte (siehe Schema). Die Befruchtungsergebnisse in diesen drei Zeiträumen wurden miteinander verglichen, um eine Bewertung der Befruchtungspersistenz vornehmen zu können. Zur Auswertung des Versuchsabschnitts III stand vom Rechenzentrum der FU Berlin der SIEMENS-Rechner 7.545/51 zur Verfügung. Dabei wurde für die Berechnung und statistische Auswertung das Programmpaket BMDP (DIXON, 1981) angewendet.

3.1.9 Statistische Methoden

Die zur statistischen Auswertung verwendeten Signifikanztests sind nach LORENZ (1984) in erster Linie ein Werkzeug der konfirmatorischen Datenanalyse. Darunter versteht man die Beurteilung der Daten, die aufgrund eines statistischen

Versuchsplans gewonnen wurden. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten wurden alle über einen konkreten Versuchsplan gewonnen (vergleiche Abschnitt 3.1.7), es waren aber nicht in jedem Fall vorformulierte Hypothesen vorgegeben. Es wurde also mehrmals unter den Bedingungen der explorativen Datenanalyse gearbeitet, da oftmals Hypothesen erst im Laufe des Versuchs aufgestellt wurden. Trotz dieser Situation ist die Anwendung von Signifikanztests von informativem Wert.

Im Versuchsabschnitt III wurde ein statistischer Vergleich zwischen den beiden Verdünnern bei jeder Zentrifugationsstufe über den WELCH-Test (LORENZ, 1984) vorgenommen. Es wurde ein Vergleich über errechnete Flächenmaßzahlen, die den Verlust an beweglichen Spermien in der Zeit bis zu einer Stunde nach der Zentrifugation in Abständen von jeweils 10 Minuten enthalten, angestellt. Dieser Test mußte angewendet werden, da aufgrund des Konstruktionsprinzips zwar eine hinreichende Normalverteilung der Meßwerte vorlag, die Standardabweichungen der zu vergleichenden Werte aber jeweils verschieden waren.

Da in den Käfigen jeweils zwei Hennen untergebracht waren, erfolgte die Verteilung der Hennen auf die einzelnen Besamungsgruppen käfigweise durch die Anwendung von Zufallszahlen (Random numbers) nach den Tabellen von FISHER und YATES (1963). Der statistische Vergleich der Befruchtungsergebnisse erfolgte über die Intervallschätzung, wobei das 95%-Konfidenzintervall als Maß genommen wurde, und zwar nach der folgenden Formel (LORENZ, 1984):

$$\begin{matrix} p_u \\ p_o \end{matrix} = p \pm 2 \sqrt{V(p)}$$

p = Befruchtungsergebnis einer Gruppe

p_u = untere Konfidenzgrenze für p

p_o = obere Konfidenzgrenze für p

$V(p)$ = geschätzte Varianz von p

Diese Konfidenzbereiche wurden dann zum Vergleich grafisch gegenübergestellt. Immer dann, wenn sich die Konfidenzbereiche nicht überschneiden, liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Befruchtungsergebnissen vor.

Die Errechnung der Varianzen erfolgte nach der Verhältnisschätzfunktion und nach der Binomialfunktion (COCHRAN, 1972).

Binomialfunktion:
$$V_{(pb)} = \frac{p \times (1-p)}{n}$$

p = Anteil der befruchteten Eier in einer Gruppe

n = Gesamtzahl der Eier in einer Gruppe

Verhältnisschätzfunktion:

$$V_{(pv)} = \frac{1}{n \times m^{-2}} \times \frac{\sum a_i^2 - 2p \sum a_i m_i + p^2 \sum m_i^2}{n - 1}$$

n = Anzahl der Käfige pro Gruppe, d.h. jeweils 6

m = Anzahl der Eier in den einzelnen Käfigen

$\bar{m}$ = durchschnittliche Anzahl der Eier in den Käfigen

p = Anteil der befruchteten Eier in einer Gruppe

a = Anzahl der befruchteten Eier in den einzelnen Käfigen

Die Binomialformel setzt voraus, daß die Hennen wie bei Verwendung von nativem Sperma auch bei Verwendung von Tiefgefriersperma homogen in Bezug auf ihr Befruchtungsergebnis sind. Da dies aber nicht vorausgesetzt werden kann, müssen die Befruchtungsergebnisse in erster Linie mit der Verhältnisschätzfunktion verglichen werden. In dieser Formel wird berücksichtigt, daß die Verteilung der befruchteten Eier innerhalb der einzelnen Käfige sehr unterschiedlich sein kann.

Die geschätzte Varianz wird allerdings nach der Binomialformel immer dann größer als nach der Verhältnisschätzformel, wenn ein sehr ähnliches Befruchtungsergebnis zwischen den einzelnen Käfigen einer Gruppe vorliegt. Da die Käfige mit jeweils zwei Hennen besetzt sind, kann es zum Beispiel der Fall sein, daß jeweils eine Henne in den Käfigen befruchtete Eier legt und die andere Henne nur unbefruchtete Eier. In diesem Fall wird aber die unterschiedliche Verteilung der befruchteten Eier auf die einzelnen Hennen nicht mehr deutlich. Da dieser Fall aber nur selten auftrat, wurde bei der Betrachtung der aufbereiteten Befruchtungsergebnisse nur die nach der Verhältnisschätzfunktion errechnete Standardabweichung verwendet. In den Fällen, wo die Standardabweichung nach der Binomialfunktion größer war als nach der Verhältnisschätzfunktion wurde diese Tatsache entsprechend diskutiert.

3.2 Versuchsergebnisse

3.2.1 Vorversuche

In Vorversuchen wurde der Einfluß des Zentrifugierens der Samenverdünnungen über einen Zeitraum von 15 Minuten bei verschiedenen Temperaturen bzw. bei verschiedenen Verdünnungsgraden des Spermas untersucht. Für alle Untersuchungen wurde der Verdünner I verwendet. Neben der Beurteilung der Spermienmotilität unmittelbar nach der Zentrifugation erfolgten auch weitere Beurteilungen über eine Stunde in zehnmütigen Abständen sowie 90 und 120 Minuten nach dem Zentrifugieren. Es wurde im Bereich von 800 bis 3000 U/Minute zentrifugiert, was einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 120 bis 1670 g entspricht.

In dem für diese Versuche verwendeten Sperma betrug der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen 65% (Tabelle 2) bzw. 60% (Tabelle 3). Das Verdünnungsverhältnis der in Tabelle 2 aufgeführten Versuchswerte betrug 1:2 (Sperma : Verdünner). Die in Tabelle 3 aufgeführten Werte wurden nach einer Zentrifugation über 15 Minuten bei +5°C ermittelt. Das Sperma wurde danach bei +25°C gehalten.

Aus den Ergebnissen beider Tabellen wird deutlich, daß beim Zentrifugieren mit steigenden Umdrehungszahlen der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien sowohl unmittelbar nach der Zentrifugation wie auch im weiteren Verlauf stark abfällt. Dieser Abfall der Spermienmotilität deutet darauf hin, daß mit Erhöhung der Umdrehungszahlen beim Zentrifugieren zunehmend mehr Samenzellen geschädigt wurden.

Aus den aufgeführten Versuchsergebnissen ist zu erkennen, daß das Zentrifugieren der Samenverdünnungen nach dem Auftauen mit steigenden Umdrehungszahlen eine immer größer werdende Beeinflussung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien darstellt (Tabelle 2). Die besten Ergebnisse mit 43%

vorwärtsbeweglicher Spermien wurden noch 120 Minuten nach der Zentrifugation bei 800 U/Minute beobachtet, wenn das Zentrifugieren bei +5°C erfolgte und die Samenverdünnungen anschließend bei der gleichen Temperatur gehalten wurden. Mit steigenden Umdrehungszahlen bzw. bei einer Vergrößerung der RZB nahmen die Werte ab, und bei 3000 U/Minute waren vergleichsweise nur noch 23% der Spermien in Vorwärtsbewegung (Tabelle 2, Tabelle 3). Deutlich schlechter waren die Ergebnisse jedoch, wenn die Zentrifugation bei +25°C erfolgte oder die Samenverdünnungen nach dem Zentrifugieren bei +25°C gehalten wurden.

Aus den Angaben der Tabelle 3 ist zu ersehen, daß wie die Umdrehungszahl/Minute auch der Verdünnungsgrad des Spermas einen Einfluß auf die Spermienmotilität ausübt. Das Verdünnungsverhältnis von 1:2 war bei allen untersuchten Umdrehungszahlen günstiger als das Verdünnungsverhältnis von 1:4 oder 1:6.

In beiden Versuchsreihen wurde festgestellt, daß bei den Umdrehungszahlen von 800 bzw. 1000 pro Minute keine exakte Trennung zwischen Sperma und Überstand durch die Zentrifugation erfolgte.

Tabelle 2: Prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Zentrifugation (15 min) bei Temperaturen von +5°C und +25°C sowie bei unterschiedlicher KZB (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen)

Umdrehungs- zahlen pro minute	KZB	Temperatur (°C) während der Zentrifugation	nach der Zentrifugation	Zeit nach Zentrifugation (Minuten)										
				0	10	20	30	40	50	60	90	120		
800	120 g	5	5	60	56,6	56,6	53,3	50	46,6	46,6	43,3	43,3		
		5	25	60	56,6	50	40	36,6	20	10	-	-		
		25	25	50	40	30	20	10	6,6	-	-	-		
1000	180 g	5	5	56,6	56,6	50	50	46,6	46,6	46,6	43,3	40		
		5	25	60	53,3	50	36,6	30	16,6	6,6	-	-		
		25	25	46,6	40	30	16,6	6,6	3,3	-	-	-		
1200	260 g	5	5	53,3	50	50	43,3	43,3	40	40	40	40		
		5	25	56,6	50	40	36,6	30	16,6	6,6	-	-		
		25	25	40	36,6	23,3	10	6,6	-	-	-	-		
1400	360 g	5	5	50	46,6	46,6	43,3	43,3	40	40	36,6	36,6		
		5	25	53,3	50	40	33,3	30	13,3	6,6	-	-		
		25	25	40	33,3	20	10	6,6	-	-	-	-		
1600	470 g	5	5	50	46,6	43,3	43,3	40	40	40	40	36,6		
		5	25	50	46,6	36,6	30	23,3	10	3,3	-	-		
		25	25	40	30	16,6	6,6	3,3	-	-	-	-		
1800	600 g	5	5	46,6	46,6	43,3	40	40	40	40	36,6	36,6		
		5	25	50	43,3	30	20	10	-	-	-	-		
		25	25	33,3	26,6	10	10	-	-	-	-	-		

Tabelle 2: (Fortsetzung)

Umdrehungs- zahlen pro Minute	KZB	Temperatur (°C)		Zeit nach Zentrifugation (Minuten)									
		während der Zentrifugation	nach der Zentrifugation	0	10	20	30	40	50	60	90	120	
2000	740 g	5	5	46,6	43,3	40	40	36,6	36,6	33,3	33,3	33,3	
		5	25	46,6	40	30	26,6	20	10	-	-	-	
		25	25	30	23,3	10	3,3	-	-	-	-	-	
2200	900 g	5	5	46,6	40	40	40	36,6	33,3	33,3	33,3	30	
		5	25	46,6	40	30	20	10	3,3	-	-	-	
		25	25	30	20	10	3,3	-	-	-	-	-	
2400	1060 g	5	5	43,3	40	36,6	36,6	33,3	33,3	30	30	30	
		5	25	43,3	36,6	23,3	13,3	6,6	-	-	-	-	
		25	25	26,6	20	6,6	-	-	-	-	-	-	
2600	1250 g	5	5	40	36,6	36,6	36,6	33,3	30	30	26,6	26,6	
		5	25	40	36,6	23,3	10	6,6	-	-	-	-	
		25	25	26,6	16,6	6,6	-	-	-	-	-	-	
2800	1450 g	5	5	40	36,6	33,3	30	30	30	30	26,6	26,6	
		5	25	40	30	20	10	-	-	-	-	-	
		25	25	23,3	10	3,3	-	-	-	-	-	-	
3000	1670 g	5	5	36,6	36,6	30	30	26,6	26,6	26,6	23,3	23,3	
		5	25	36,6	30	20	6,6	-	-	-	-	-	
		25	25	20	10	-	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 3: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Zentrifugation über 15 Minuten bei +5°C (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen im Verdünner I)

Umdrehungs- zahlen pro Minute	RZB	Verdünnungs- verhältnis	Zeit nach Ende der Zentrifugation (Minuten)							
			0	10	20	30	40	50	60	
800	120 g	1:2	56,6	50	40	30	26,6	20	10	
		1:4	53,3	50	40	30	23,3	16,6	10	
		1:6	53,3	46,6	40	30	23,3	16,6	6,6	
1000	180 g	1:2	53,3	50	40	30	23,3	16,6	6,6	
		1:4	53,3	46,6	40	30	23,3	13,3	6,6	
		1:6	53,3	46,6	40	26,6	20	13,3	6,6	
1200	260 g	1:2	50	50	40	30	20	10	3,3	
		1:4	50	46,6	36,6	26,6	20	10	-	
		1:6	50	43,3	36,6	23,3	20	10	-	
1400	360 g	1:2	50	46,6	36,6	30	20	10	-	
		1:4	50	40	36,6	23,3	20	6,6	-	
		1:6	50	43,3	36,6	23,3	20	10	-	
1600	470 g	1:2	46,6	46,6	36,6	26,6	20	10	-	
		1:4	46,6	40	33,3	26,6	16,6	3,3	-	
		1:6	46,6	40	30	20	13,3	3,3	-	
1800	600 g	1:2	46,6	40	30	20	13,3	6,6	-	
		1:4	46,6	36,6	30	20	16,6	3,3	-	
		1:6	43,3	40	30	20	13,3	3,3	-	
2000	740 g	1:2	43,3	40	30	20	10	3,3	-	
		1:4	46,6	40	30	20	10	3,3	-	
		1:6	43,3	43,3	26,6	16,6	10	-	-	
2200	900 g	1:2	43,3	40	30	20	10	6,6	-	
		1:4	40	40	26,6	16,6	6,6	-	-	
		1:6	40	40	26,6	16,6	6,6	-	-	
2400	1060 g	1:2	40	40	30	20	10	3,3	-	
		1:4	40	36,6	26,6	13,3	3,3	-	-	
		1:6	40	36,6	23,3	16,6	6,6	-	-	
2600	1250 g	1:2	40	36,6	26,6	13,3	10	-	-	
		1:4	40	30	20	10	-	-	-	
		1:6	40	30	20	13,3	3,3	-	-	
2800	1450 g	1:2	36,6	30	20	13,3	3,3	-	-	
		1:4	36,6	30	20	10	-	-	-	
		1:6	40	30	20	10	3,3	-	-	
3000	1670 g	1:2	36,6	30	20	10	-	-	-	
		1:4	33,3	30	20	10	-	-	-	
		1:6	30	26,6	20	10	-	-	-	

3.2.2 Hauptversuche

3.2.2.1 Vergleich zwischen flacher und tiefer intravaginaler Besamung (Versuchsabschnitt I)

Im Versuchsabschnitt I wurde der Einfluß zwischen der von LAKE (1974) für die Verwendung von Tiefgefriersperma empfohlenen tiefen intravaginalen Besamung und der bei der Verwendung von Frischsperma üblichen flachen intravaginalen Insemination auf die Besamungsergebnisse untersucht. Die Entfernung des Glycerins aus der Samenverdünnung vor der Besamung erfolgte durch Zentrifugation über 15 Minuten mit einer RZB von 730 g und einer Temperatur von +5°C. Um den Einfluß der Spermienzahl auf den Befruchtungserfolg zu untersuchen, erfolgten Besamungen mit zwei unterschiedlichen Spermienmengen pro Inseminationsportion. Es wurde wie folgt vorgegangen:

1. 4 Hennengruppen wurden mit ca. 180×10^6 Spermien in 0,1 ml Inseminationsvolumen pro Henne, und
2. 4 Hennengruppen wurden mit ca. 360×10^6 Spermien in 0,2 ml Inseminationsvolumen pro Henne besamt.

Zum Vergleich wurde außerdem jeweils eine Hennengruppe mit Tiefgefriersperma besamt, dem das Glycerin vor der Besamung nicht entfernt worden war.

Für den Besamungsversuch standen 120 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der ersten Besamung insgesamt 1045 Eier legten.

Für die drei mit Tiefgefriersperma durchgeführten Besamungen wurden jeweils Mischejakulate verwendet. Die Ergebnisse der spermatologischen Befunde der zur Insemination gelangten Mischejakulate sind in der Tabelle 4 und die Resultate der durchgeführten Besamungen in Tabelle 5 und in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 4: Spermatologische Befunde der drei zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung und der Zentrifugation.

Spermamenge (ml)	9,2	9,6	9,4
Spermiendichte (Mio. pro mm ³)	3,95	4,05	3,85
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90	90	90
nach dem Auftauen	65	65	65
nach der Zentrifugation	55	55	55

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, ist die bei Insemination von Frischsperma übliche flache intravaginale Besamung bei Verwendung von Tiefgefriersperma völlig ungeeignet. Von 440 gelegten Eiern wurden mit dieser Besamungsmethode lediglich 3 Eier befruchtet, und zwar alle bei der Verwendung der höheren Besamungsportion von 0,2 ml (1,8% bei Samenportionen, denen das Glycerin nach dem Auftauen entfernt worden war; 0,9% bei glycerinhaltigen Samenportionen).

Bei der tiefen intravaginalen Besamung konnte nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 730 g mit einer Besamungsportion von 0,2 ml ein Befruchtungsergebnis von 27,7% erzielt werden, während mit einer Portion von 0,1 ml pro Henne nur 19,4% der gelegten Eier befruchtet waren. Bemerkenswert ist, daß mit Samenportionen, denen das Glycerin nicht entfernt worden war, bei der tiefen Inseminationsmethode noch Befruchtungsergebnisse von knapp 10% erreicht werden konnten.

Aus den Ergebnissen ist weiterhin zu ersehen, daß nach alleinigem Zusatz von Verdünner I zum Frischsperma mit 62,4% ein niedrigeres Befruchtungsergebnis erzielt wurde, als dies

Tabelle 5: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma sowie mit verdünntem und unverdünntem Frischsperma mit und ohne Entfernung des Glycerins aus der Samenverdünnung mit unterschiedlichen Dosierungen bei flacher und tiefer intravaginaler Insemination

Art des verwendeten Spermas	Entfernung des Glycerins vor der Besamung (RZB=730 g)	Art der intravaginalen Besamung	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
			2.-13. Tag $\frac{E}{B} (\%)$	2.-5. Tag $\frac{E}{B} (\%)$	6.-9. Tag $\frac{E}{B} (\%)$	10.-13. Tag $\frac{E}{B} (\%)$
TG 0,1 ml	nein	flach	$\frac{111}{0}$	$\frac{37}{0}$	$\frac{38}{0}$	$\frac{36}{0}$
TG 0,2 ml	nein	flach	$\frac{112}{1}(0,9)$	$\frac{35}{1}(2,9)$	$\frac{40}{0}$	$\frac{37}{0}$
TG 0,1 ml	nein	tief	$\frac{90}{6}(6,7)$	$\frac{30}{3}(10,0)$	$\frac{28}{2}(7,2)$	$\frac{32}{1}(3,1)$
TG 0,2 ml	nein	tief	$\frac{103}{10}(9,7)$	$\frac{38}{5}(13,5)$	$\frac{33}{4}(12,1)$	$\frac{32}{1}(3,1)$
TG 0,1 ml	ja	flach	$\frac{105}{0}$	$\frac{37}{0}$	$\frac{31}{0}$	$\frac{37}{0}$
TG 0,2 ml	ja	flach	$\frac{112}{2}(1,8)$	$\frac{39}{2}(5,1)$	$\frac{36}{0}$	$\frac{37}{0}$
TG 0,1 ml	ja	tief	$\frac{93}{18}(19,4)$	$\frac{33}{9}(27,3)$	$\frac{33}{7}(21,2)$	$\frac{27}{2}(7,4)$
TG 0,2 ml	ja	tief	$\frac{101}{28}(27,7)$	$\frac{33}{13}(39,4)$	$\frac{35}{13}(37,1)$	$\frac{33}{2}(6,1)$
Frisch- sperma + Verd. I	---	flach	$\frac{109}{68}(62,4)$	$\frac{39}{28}(71,8)$	$\frac{33}{23}(69,7)$	$\frac{37}{17}(45,9)$
Frisch- sperma, unverd.	---	flach	$\frac{109}{91}(83,5)$	$\frac{35}{31}(88,6)$	$\frac{35}{29}(82,9)$	$\frac{39}{31}(79,5)$

$\frac{E}{B}$ = $\frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. lebende Embryonen am 14. Tag}}$

TG = Tiefgefriersperma

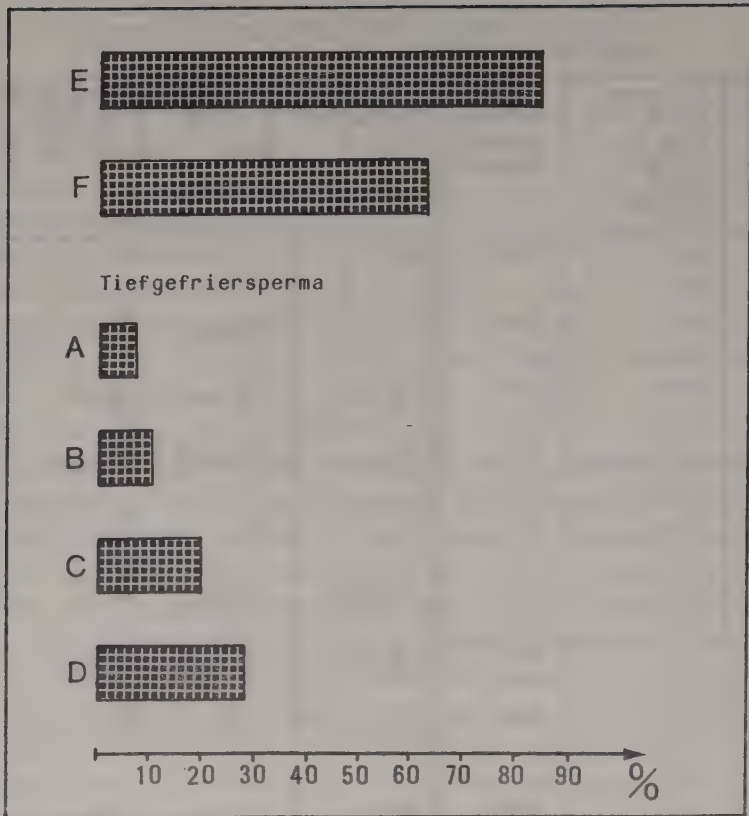


Abb. 1: Befruchtungsergebnisse nach tiefer intravaginaler Besamung und der Kontrollgruppen E und F (im gesamten Versuchszeitraum vom 2.-13. Tag nach erster Besamung)
A = Besamungsdosis 0,1 ml; ohne Entfernung des Glycerins
B = Besamungsdosis 0,2 ml; ohne Entfernung des Glycerins
C = Besamungsdosis 0,1 ml; Entfernung des Glycerins vor der Besamung
D = Besamungsdosis 0,2 ml; Entfernung des Glycerins vor der Besamung
E = Besamungsdosis 0,1 ml; Frischsperma, verdünnt mit Verdüner I
F = Besamungsdosis 0,05 ml; Frischsperma, unverdünnt

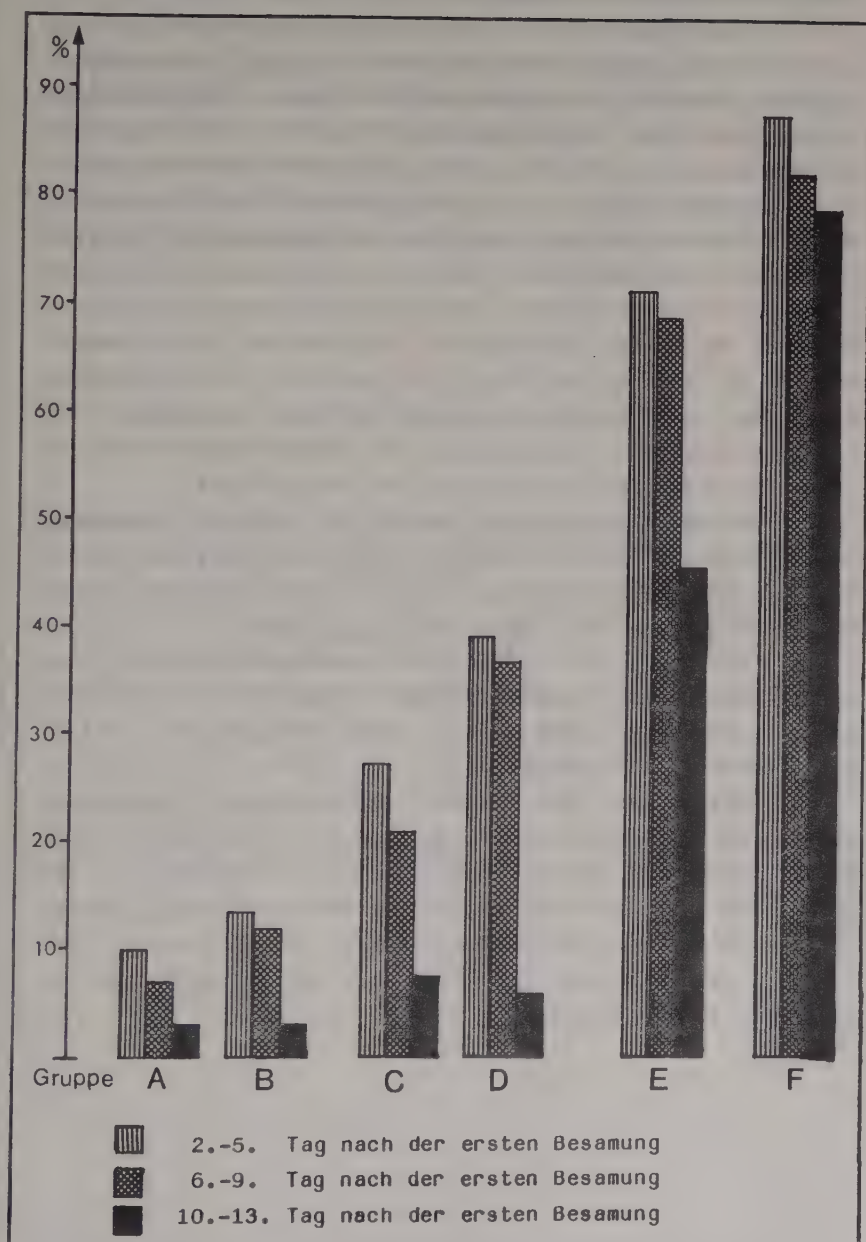


Abb. 2: Befruchtungsergebnisse nach tiefen intravaginalen Besamungen mit Tiefgefriersperma sowie mit Frischsperma, getrennt in drei Sammelzeiträume.
(Einteilung siehe Abbildung 1)

mit unverdünntem Frischsperma der Fall war, wo es über den gesamten Sammelzeitraum (2.-13. Tag) insgesamt 83,5% betrug.

In der Abbildung 2 sind die in der Tabelle 5 zusammengestellten Befruchtungsergebnisse der tiefen intravaginalen Besamung sowie der Kontrollgruppen (E und F) nach Legezeiträumen (2.-5., 6.-9. und 10.-13. Tag nach der ersten Besamung) getrennt grafisch dargestellt. Hier ist zu erkennen, daß die Befruchtungspersistenz bei der Besamung mit Tiefgefriersperma deutlich kürzer ist, als bei Inseminationen mit unverdünntem Frischsperma. Sie reicht danach nur bis zum 9. Tag nach der ersten Besamung (4. Tag nach der letzten Besamung). Im Zeitraum vom 5.-8. Tag nach der letzten Besamung waren nur noch sechs befruchtete Eier bei Verwendung von Tiefgefriersperma zu gewinnen. Die Befruchtungsergebnisse lagen für diese Zeit nur noch im Bereich von 3-7%.

Das Befruchtungsergebnis, das mit der größeren Besamungsdosis (Gruppe D) erreicht wurde, lag in der Zeit vom 2.-9. Tag nach der ersten Besamung sogar bei 38,2%, während es bei Verwendung der halben Portion nur 25,8% betrug.

Bei Verwendung von verdünntem Frischsperma erfolgte ein Abfall der Befruchtungspersistenz in der Zeit vom 10.-13. Tag nach der ersten Besamung auf 45,9% im Gegensatz zu 79,5% mit unverdünntem Frischsperma.

Die Ergebnisse der flachen intravaginalen Besamungen wurden der statistischen Betrachtung nicht unterzogen, da diese Ergebnisse mit 1,8 bzw. 0,9% im Vergleich zu den Inseminationsergebnissen bei tiefer Besamung völlig uninteressant waren. Die geschätzten Varianzen der Ergebnisse der tiefen intravaginalen Besamung sind in Tabelle 6 und in Abbildung 3 dargestellt.

Die Befruchtungsergebnisse von 19,4 und 27,7%, die mit Tiefgefriersperma erzielt wurden, dem das Glycerin vor der Besamung durch Zentrifugation entfernt worden war, waren signifikant höher als die Ergebnisse, die mit entsprechenden Portionen ohne Glycerinentfernung erzielt werden konnten. Das Befruchtungsergebnis von 27,7%, das mit einer Dosis von 0,2 ml (ca. 360×10^6 Spermien) pro Henne erzielt wurde, liegt zwar deutlich über dem von 19,4%, das mit der halben Portion erzielt wurde, ist aber nicht signifikant höher.

Tabelle 6: Befruchtungsergebnisse sowie deren Standardabweichungen nach tiefer intravaginaler Besamung (vergleiche Tabelle 5)

Gruppe	Befruchtungsergebnisse (%)	$\sqrt{v_{(pv)}}$	$\sqrt{v_{(pb)}}$
A	6,7	2,8	2,7
B	9,7	3,3	2,9
C	19,4	3,2	3,0
D	27,7	4,4	4,4

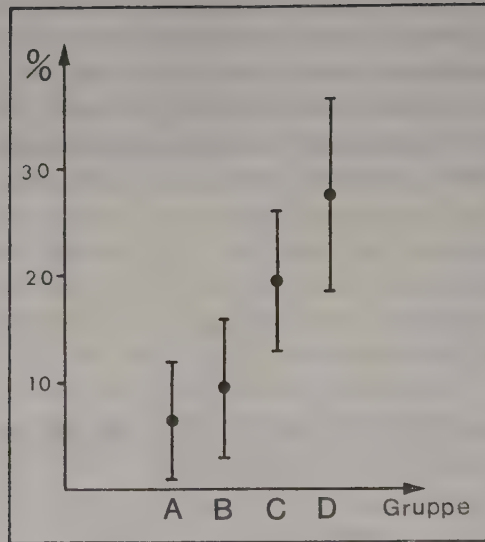


Abb. 3: Befruchtungsergebnisse der tiefen intravaginalen Besamungen mit den entsprechenden Konfidenzintervallen (doppelte Standardabweichung); Gruppeneinteilung nach Abbildung 1

3.2.2.2 Tiefe intravaginale Besamung bei Verwendung von Sperma mit den Verdünnungsraten 1:2, 1:4 und 1:6 (Samen : Verdünner) (Versuchsabschnitt II)

In diesem Versuchsabschnitt erfolgte ein Vergleich zwischen Besamungen mit Tiefgefriersperma, das in drei verschiedenen Graden verdünnt wurde. Als Verdünner kam der Saccharid-Glutaminat-Verdünner nach SCHRAMM und LÖHLE (1976) zum Einsatz. Das Glycerin wurde vor der Besamung durch Zentrifugation bei +5°C mit einer RZB von 280 bzw. 730 g über 15 Minuten entfernt. Neben den Besamungen mit so behandeltem Sperma erfolgten zum Vergleich Besamungen mit Tiefgefriersperma ohne Entfernung des Glycerins und mit unterschiedlich verdünntem Frischsperma.

Für den Besamungsversuch standen 156 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der ersten Besamung insgesamt 1315 Eier legten.

Für die drei Besamungstage wurden die in Tabelle 7 aufgeführten sechs Mischejakulate verwendet, für den ersten Besamungstag die Mischejakulate 1 und 2, für den zweiten Besamungstag die Mischejakulate 3 und 4 und für den dritten Besamungstag die Mischejakulate 5 und 6. Da pro Besamungstag zwei Mischejakulate nötig waren, wurden diese vor der Besamung im Verhältnis 1:2 vermischt.

Aus Tabelle 7 ist zu ersehen, daß in Spermiendichte (ca. 4,0 Mio. pro mm³) und Motilität nach Gewinnung (90%) gleichwertige Ejakulate zum Einsatz kamen. Die Vorwärtsbewegung der Spermien nach dem Auftauen bzw. nach der Zentrifugation bei einer RZB von 280 g oder 730 g war mit Durchschnittswerten von 65,0, 57,5 und 47,5% beim Verdünnungsverhältnis von 1:4 am besten. Diese Werte lagen beim Verdünnungsverhältnis von 1:2 bei 52,5, 56,7 und 45% und beim Verdünnungsverhältnis von 1:6 bei 61,7, 53,3 und 43,3%. Die Befruchtungsergeb-

nisse, die mit diesem Sperma erzielt werden konnten, sind in Tabelle 8 und in den Abbildungen 4 und 5 zusammengestellt.

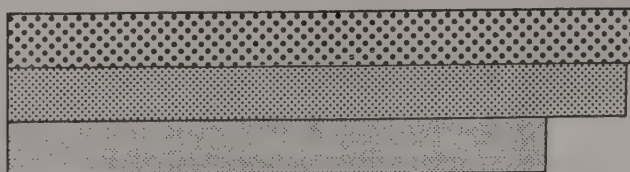
Tabelle 7: Spermatologische Befunde der sechs zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung und der Zentrifugation

Spermamenge (ml)		9,5	9,0	9,5	9,1	8,8	9,0
Spermiendichte $\times 10^6$ (Mio. pro mm ³)		3,85	4,05	3,90	4,05	4,10	4,10
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung		90	90	90	90	90	90
nach dem Auftauen 1:2		65	60	65	60	65	60
- " - 1:4		65	65	65	65	65	65
- " - 1:6		60	60	60	65	65	60
nach Zentrifugation mit 280 g 1:2		60	55	55	55	60	55
- " - 1:4		60	60	60	55	55	55
- " - 1:6		55	55	50	50	55	55
nach Zentrifugation mit 730 g 1:2		50	45	45	45	40	45
- " - 1:4		50	45	50	45	50	45
- " - 1:6		45	40	45	45	40	45

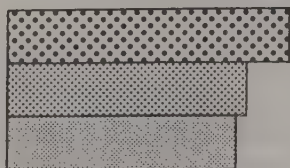
Tabelle 8: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 280 bzw. 730 g und mit Frischsperma in drei verschiedenen Verdünnungsgraden sowie mit unverdünntem Frischsperma

Glycerin- entfer- nung mit RZB von	Verd.- verh.	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
		2.-13. Tag $\frac{E}{B}$ (%)	2.-5.Tag $\frac{E}{B}$ (%)	6.-9. Tag $\frac{E}{B}$ (%)	10.-13. Tag $\frac{E}{B}$ (%)
----	1:2	$\frac{103}{9}(8,7)$	$\frac{35}{4}(11,4)$	$\frac{33}{5}(15,2)$	$\frac{35}{0}$
----	1:4	$\frac{114}{9}(7,9)$	$\frac{35}{4}(11,4)$	$\frac{40}{4}(10,0)$	$\frac{39}{1}(2,6)$
----	1:6	$\frac{88}{7}(7,9)$	$\frac{34}{5}(14,7)$	$\frac{26}{2}(7,7)$	$\frac{28}{0}$
280 g	1:2	$\frac{95}{9}(9,5)$	$\frac{33}{5}(15,2)$	$\frac{27}{4}(14,8)$	$\frac{35}{0}$
280 g	1:4	$\frac{89}{6}(6,7)$	$\frac{33}{4}(12,1)$	$\frac{23}{2}(6,9)$	$\frac{27}{0}$
280 g	1:6	$\frac{99}{1}(1,0)$	$\frac{36}{1}(2,8)$	$\frac{34}{0}$	$\frac{29}{0}$
730 g	1:2	$\frac{110}{29}(26,4)$	$\frac{32}{13}(40,6)$	$\frac{40}{13}(32,5)$	$\frac{38}{3}(7,9)$
730 g	1:4	$\frac{94}{21}(22,3)$	$\frac{32}{10}(31,3)$	$\frac{33}{9}(27,3)$	$\frac{29}{2}(6,9)$
730 g	1:6	$\frac{80}{17}(21,3)$	$\frac{30}{10}(33,3)$	$\frac{26}{6}(23,1)$	$\frac{24}{1}(4,2)$
Frish- sperma	1:2	$\frac{109}{64}(58,7)$	$\frac{36}{25}(69,4)$	$\frac{37}{23}(62,2)$	$\frac{36}{16}(44,4)$
- "-	1:4	$\frac{110}{64}(58,2)$	$\frac{34}{24}(70,6)$	$\frac{36}{25}(69,4)$	$\frac{40}{15}(37,5)$
- "-	1:6	$\frac{109}{55}(50,6)$	$\frac{37}{25}(67,6)$	$\frac{35}{21}(60,0)$	$\frac{37}{9}(24,3)$
Frishsperma unverdünnt		$\frac{115}{94}(81,7)$	$\frac{38}{32}(84,2)$	$\frac{39}{32}(82,1)$	$\frac{38}{30}(78,9)$
$\frac{E}{B} = \frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$					

1. Frischsperma



2. Glycerinentfernung mit 730 g



3. Glycerinentfernung mit 280 g



4. ohne Glycerinentfernung

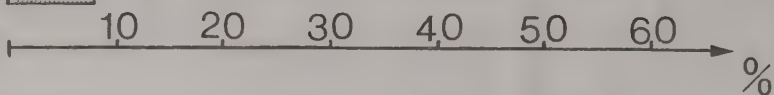
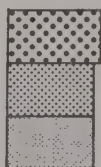


Abb. 4: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit unterschiedlichen Zentrifugalbeschleunigungen sowie mit Frischsperma in jeweils drei Verdünnungsgraden (2.-13. Tag nach der ersten Besamung)

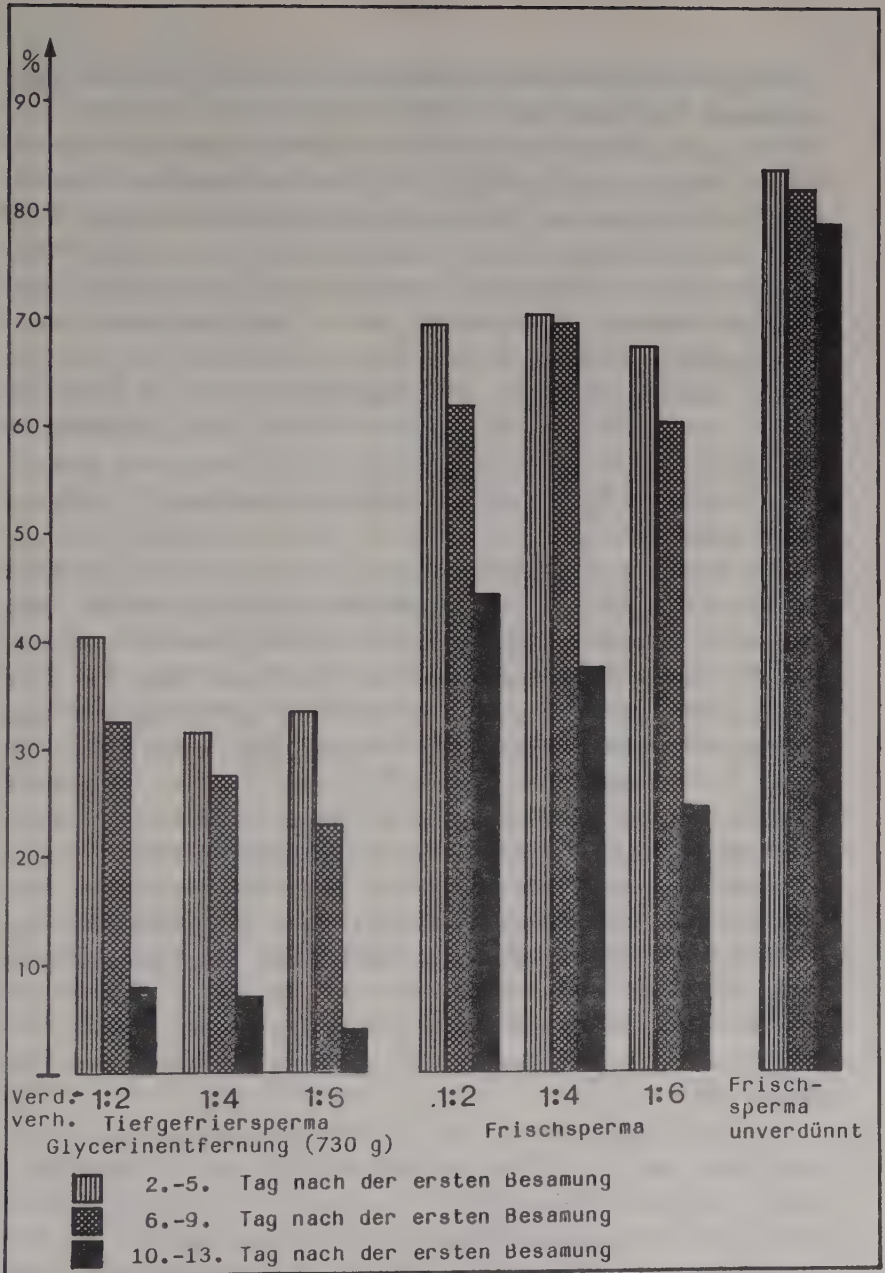


Abb. 5: Befruchtungsergebnisse von Tiefgefrriersperma nach Entfernung des Glycerins sowie mit verdünntem und unverdünntem Frischsperma, unterteilt in drei Sammelzeiträume

Aus den Befruchtungsergebnissen, die in Tabelle 8 und Abbildung 4 zusammengestellt sind, geht hervor, daß bei Verwendung von Tiefgefriersperma die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 730 g aus den Samenverdünnungen entfernt worden war. Die Befruchtungsergebnisse, die mit den Verdünnungsstufen 1:4 und 1:6 erzielt wurden, lagen bei 22,3 und 21,3%, während bei Verwendung von Sperma, das 1:2 verdünnt worden war, ein Ergebnis von 26,4% erzielt werden konnte.

Mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung nur mit einer RZB von 280 g entfernt worden war, sowie mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin nicht entfernt worden war, wurden nur Befruchtungsergebnisse erzielt, die zwischen 7 und 10% lagen.

Das Verdünnungsverhältnis von 1:2 erwies sich als günstiger als die anderen Verdünnungsgrade. So konnte hierbei auch das beste Ergebnis mit Tiefgefriersperma erreicht werden (26,45% bei Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 730 g). Aber auch ohne bzw. mit Entfernung des Glycerins bei 280 g waren die besten Ergebnisse mit 8,7 bzw. 9,5% mit einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 zu erreichen.

Wie im Versuchsabschnitt I zeigte sich auch in diesem Versuchsabschnitt, daß mit verdünntem Frischsperma mit 50-59% geringere Befruchtungsraten zu erzielen waren als mit unverdünntem Frischsperma (81,7%). Bei Verwendung von verdünntem Frischsperma war das Ergebnis, das mit einer Verdünnung von 1:6 erreicht werden konnte, mit 50,6% wesentlich schlechter als die Ergebnisse, die bei Verwendung von Sperma erzielt wurden, das 1:2 (58,7%) bzw. 1:4 (58,2%) verdünnt worden war.

In Abbildung 5 wird, wie im Versuchsabschnitt I, sehr deutlich, daß die Befruchtungspersistenz von Tiefgefriersperma wesentlich kürzer ist, als bei Frischsperma, obwohl auch hier bereits ein Abfall der Befruchtungspersistenz bei verdünntem Frischsperma zu erkennen ist. So konnten in der

Zeit vom 5.-8. Tag nach der letzten Besamung bei Verwendung von Tiefgefriersperma nur sieben befruchtete Eier gewonnen werden, die Befruchtungsraten von 4-8% entsprechen. Sechs dieser befruchteten Eier wurden von den Hennen gelegt, die mit Tiefgefriersperma besamt wurden, dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 730 g entfernt wurde. Bei Zugrundelegung eines Sammelzeitraumes vom 2. Tag nach der ersten Besamung bis zum 4. Tag nach der letzten Besamung betrugen die Befruchtungsergebnisse bei diesen Hennengruppen 36,1% (1:2-Verdünnung), 28,2% (1:4-Verdünnung) und 28,5% (1:6-Verdünnung).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist aus der Tabelle 9 ersichtlich, und in Abbildung 6 wurden die Befruchtungsergebnisse mit den entsprechenden Konfidenzbereichen dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß bei allen drei Verdünnungsstufen mit dem Sperma, bei dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 730 g entfernt worden war, ein signifikant höheres Ergebnis erzielt werden konnte, als mit Sperma der gleichen Verdünnungsstufen, bei dem das Glycerin nicht oder nur mit einer RZB von 280 g entfernt worden war.

In den Gruppen 8 und 9 ist die geschätzte Standardabweichung nach der Verhältnisschätzfunktion mit 4,0 kleiner als nach der Binomialfunktion mit 4,3 bzw. 4,6. In beiden Fällen ist die Abweichung aber so gering, daß diese Erscheinung für die Bewertung der Signifikanz unbedeutend ist.

Tabelle 9: Befruchtungsergebnisse sowie deren Standardabweichungen nach tiefer intravaginaler Besamung (vergleiche Tabelle 8)

Gruppe	RZB (g)	Verd.-verh.	Befruchtungsergebnis (%)	$\sqrt{v_{(pv)}}$	$\sqrt{v_{(pb)}}$
1	---	1:2	8,7	3,8	2,8
2	---	1:4	7,9	2,7	2,5
3	---	1:6	7,9	2,5	2,3
4	280	1:2	9,5	3,0	2,9
5	280	1:4	6,7	3,3	2,7
6	280	1:6	1,0	1,1	1,0
7	730	1:2	26,4	4,2	4,2
8	730	1:4	22,3	4,0	4,3
9	730	1:6	21,3	3,5	4,0

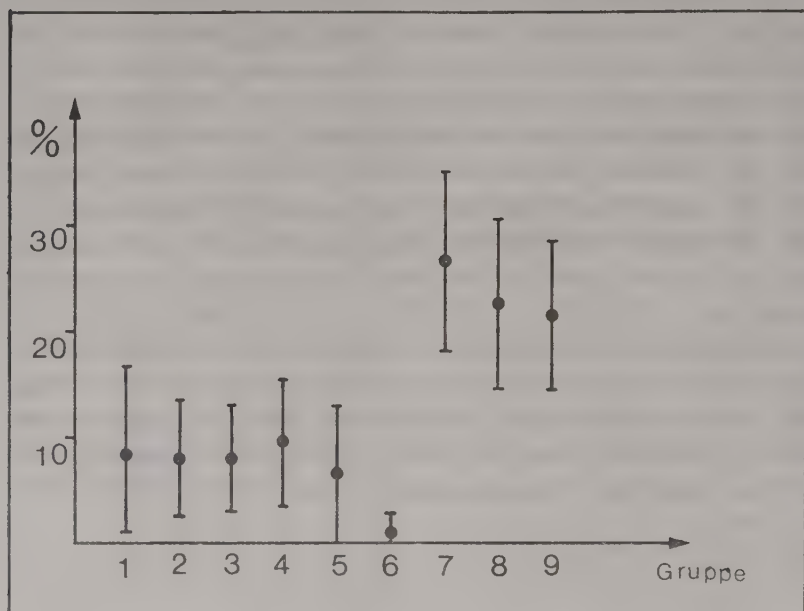


Abb. 6: Befruchtungsergebnisse der tiefen intravaginalen Besamungen mit den entsprechenden Konfidenzintervallen (doppelte Standardabweichung), Gruppeneinteilung siehe Tabellen 8 und 9

3.2.2.3 Effekte der Zentrifugation auf die Motilität von Hahnenspermien (Versuchsabschnitt III)

Im Versuchsabschnitt III wurde der Einfluß der Zentrifugation auf Hahnenspermien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die in der Tabelle 10 aufgeführten Mischejakulate zur Hälfte sowohl mit Verdünner I wie auch mit Verdünner II jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Tabelle 10: Spermatologische Befunde der vier zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung

Mischejakulate	A	B	C	D
Spermienmenge (ml)	7,5	6,8	8,2	7,8
Spermiendichte (Mio. pro mm ³)	4,2	4,1	4,0	4,1
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90	90	90	90
nach dem Auftauen				
im Verdünner I	65	65	65	65
im Verdünner II	70	70	70	70

Von jedem Mischejakulat erfolgten in jedem Verdünner zwei getrennte Untersuchungen, wobei jede Spermienmotilitätsuntersuchung doppelt bestimmt wurde. Die Zentrifugation der Samenverdünnungen erfolgte in acht verschiedenen Stufen (280 g, 440 g, 540 g, 670 g, 820 g, 940 g, 1060 g und 1250 g). In der Tabelle 11 (Seiten 66-69) ist die Spermienmotilität über 60 Minuten nach dem Zentrifugieren nach Verdünnern und RZB getrennt dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse für die acht Zentrifugationsstufen getrennt nach Verdünnern grafisch dargestellt (Abbildungen 7 und 8).

Tabelle 11: Spermienmotilität über 60 Minuten nach der Zentrifugation (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Misch- ejakulat	Ver- dünnern	RZB (g)	Versuchszeit nach Zentrifugation (min)							
			0	10	20	30	40	50	60	
A 1	I	280	57,5	52,5	47,5	42,5	22,5	17,5	10,0	
A 2	I	280	55,0	52,5	42,5	40,0	27,5	15,0	10,0	
B 1	I	280	52,5	50,0	42,5	40,0	27,5	17,5	7,5	
B 2	I	280	55,0	50,0	45,0	37,5	25,0	10,0	10,0	
C 1	I	280	55,0	52,5	42,5	37,5	27,5	15,0	10,0	
C 2	I	280	52,5	52,5	45,0	37,5	20,0	12,5	7,5	
D 1	I	280	60,0	55,0	45,0	40,0	30,0	20,0	10,0	
D 2	I	280	52,5	50,0	47,5	40,0	30,0	20,0	10,0	
$\bar{x}$	I	280	55,0	51,9	44,7	39,4	26,3	15,9	9,4	
A 1	II	280	65,0	57,5	52,5	42,5	30,0	17,5	10,0	
A 2	II	280	62,5	60,0	52,5	42,5	30,0	17,5	7,5	
B 1	II	280	60,0	55,0	47,5	35,0	22,5	12,5	7,5	
B 2	II	280	62,5	60,0	50,0	40,0	22,5	12,5	7,5	
C 1	II	280	62,5	60,0	50,0	40,0	27,5	12,5	7,5	
C 2	II	280	62,5	55,0	55,0	40,0	27,5	12,5	7,5	
D 1	II	280	67,5	60,0	55,0	40,0	27,5	15,0	7,5	
D 2	II	280	67,5	62,5	57,5	42,5	32,5	17,5	7,5	
$\bar{x}$	II	280	63,8	58,8	52,5	41,6	27,5	18,4	7,8	
A 1	I	440	55,0	52,5	42,5	40,0	27,5	17,5	7,5	
A 2	I	440	55,0	50,0	42,5	40,0	25,0	12,5	7,5	
B 1	I	440	50,0	47,5	37,5	35,0	25,0	10,0	7,5	
B 2	I	440	52,5	47,5	42,5	35,0	22,5	10,0	10,0	
C 1	I	440	50,0	47,5	42,5	32,5	22,5	15,0	5,0	
C 2	I	440	50,0	47,5	40,0	30,0	20,0	7,5	2,5	
D 1	I	440	52,5	47,5	42,5	32,5	27,5	20,0	7,5	
D 2	I	440	55,0	52,5	42,5	37,5	27,5	20,0	10,0	
$\bar{x}$	I	440	52,5	49,1	41,6	35,3	24,7	14,1	7,2	
A 1	II	440	62,5	57,5	52,5	42,5	30,0	17,5	7,5	
A 2	II	440	60,0	57,5	50,0	40,0	27,5	15,0	10,0	
B 1	II	440	57,5	50,0	42,5	32,5	22,5	12,5	2,5	
B 2	II	440	55,0	52,5	42,5	30,0	17,5	10,0	7,5	
C 1	II	440	60,0	52,5	50,0	40,0	22,5	10,0	2,5	
C 2	II	440	57,5	52,5	50,0	40,0	22,5	10,0	7,5	
D 1	II	440	60,0	57,5	52,5	37,5	27,5	12,5	7,5	
D 2	II	440	60,0	57,5	50,0	40,0	20,0	15,0	7,5	
$\bar{x}$	II	440	59,1	54,7	48,8	37,8	23,8	12,8	6,6	

Tabelle 11: Fortsetzung

Misch- ejakulat	Ver- dünnen	RZB (g)	Versuchszeit nach Zentrifugation (min)							
			0	10	20	30	40	50	60	
A 1	I	540	50,0	47,5	37,5	35,0	20,0	12,5	7,5	
A 2	I	540	47,5	45,0	37,5	32,5	20,0	10,0	2,5	
B 1	I	540	47,5	42,5	32,5	30,0	17,5	7,5	5,0	
B 2	I	540	52,5	45,0	40,0	32,5	25,0	15,0	10,0	
C 1	I	540	50,0	42,5	40,0	30,0	17,5	12,5	5,0	
C 2	I	540	50,0	45,0	40,0	27,5	17,5	5,0	0,0	
D 1	I	540	50,0	50,0	37,5	32,5	22,5	15,0	10,0	
D 2	I	540	52,5	47,5	35,0	30,0	22,5	15,0	7,5	
$\bar{x}$	I	540	50,0	45,6	37,5	31,3	20,3	11,6	5,9	
A 1	II	540	57,5	50,0	42,5	27,5	17,5	7,5	2,5	
A 2	II	540	52,5	50,0	37,5	32,5	22,5	10,0	5,0	
B 1	II	540	52,5	47,5	37,5	27,5	17,5	7,5	0,0	
B 2	II	540	52,5	47,5	37,5	27,5	15,0	10,0	5,0	
C 1	II	540	55,0	52,5	45,0	27,5	17,5	7,5	5,0	
C 2	II	540	52,5	50,0	47,5	30,0	10,0	10,0	2,5	
D 1	II	540	57,5	55,0	47,5	35,0	20,0	15,0	2,5	
D 2	II	540	55,0	52,5	47,5	35,0	25,0	12,5	7,5	
$\bar{x}$	II	540	54,4	50,6	42,8	30,3	18,1	10,0	3,8	
A 1	I	670	47,5	40,0	30,0	27,5	17,5	10,0	2,5	
A 2	I	670	47,5	37,5	32,5	22,5	15,0	7,5	2,5	
B 1	I	670	42,5	37,5	32,5	22,5	17,5	10,0	2,5	
B 2	I	670	43,0	40,0	35,0	27,5	17,5	10,0	5,0	
C 1	I	670	47,5	42,5	37,5	25,0	15,0	10,0	5,0	
C 2	I	670	47,5	42,5	35,0	25,0	20,0	2,5	0,0	
D 1	I	670	47,5	42,5	32,5	30,0	20,0	12,5	7,5	
D 2	I	670	47,5	40,0	35,0	30,0	20,0	10,0	2,5	
$\bar{x}$	I	670	46,6	40,3	33,8	26,3	17,8	9,1	3,4	
A 1	II	670	52,5	42,5	37,5	25,0	17,5	10,0	2,5	
A 2	II	670	52,5	47,5	37,5	22,5	15,0	5,0	0,0	
B 1	II	670	50,0	42,5	35,0	22,5	10,0	5,0	0,0	
B 2	II	670	50,0	45,0	35,0	20,0	12,5	7,5	2,5	
C 1	II	670	52,5	47,5	40,0	27,5	17,5	7,5	2,5	
C 2	II	670	52,5	47,5	47,5	27,5	12,5	7,5	2,5	
D 1	II	670	52,5	47,5	42,5	27,5	20,0	7,5	0,0	
D 2	II	670	55,0	50,0	42,5	27,5	20,0	7,5	5,0	
$\bar{x}$	II	670	52,2	46,3	39,7	25,0	15,6	7,2	1,9	

Tabelle 11: Fortsetzung

Misch- ejakulat	Ver- dünnen	RZB (g)	Versuchszeit nach Zentrifugation (min)							
			0	10	20	30	40	50	60	
A 1	I	820	45,0	37,5	30,0	22,5	12,5	7,5	2,5	
A 2	I	820	45,0	35,0	30,0	20,0	12,5	7,5	0,0	
B 1	I	820	42,5	37,5	32,5	27,5	7,5	7,5	0,0	
B 2	I	820	45,0	37,5	27,5	22,5	17,5	7,5	5,0	
C 1	I	820	45,0	42,5	30,0	22,5	12,5	2,5	2,5	
C 2	I	820	45,0	40,0	30,0	22,5	20,0	10,0	2,5	
D 1	I	820	47,5	37,5	30,0	27,5	12,5	7,5	2,5	
D 2	I	820	42,5	42,5	32,5	22,5	15,0	10,0	2,5	
$\bar{x}$	I	820	44,7	38,8	30,3	23,4	13,8	7,5	2,2	
A 1	II	820	52,5	40,0	35,0	22,5	12,5	2,5	0,0	
A 2	II	820	50,0	42,5	35,0	20,0	15,0	7,5	2,5	
B 1	II	820	50,0	45,0	32,5	25,0	7,5	2,5	0,0	
B 2	II	820	50,0	45,0	37,5	27,5	12,5	5,0	0,0	
C 1	II	820	50,0	47,5	37,5	22,5	7,5	5,0	2,5	
C 2	II	820	50,0	42,5	37,5	20,0	10,0	7,5	0,0	
D 1	II	820	55,0	47,5	40,0	27,5	17,5	5,0	2,5	
D 2	II	820	50,0	47,5	40,0	25,0	10,0	7,5	2,5	
$\bar{x}$	II	820	50,9	44,7	36,9	23,8	11,6	5,3	1,3	
A 1	I	940	42,5	35,0	25,0	17,5	7,5	2,5	0,0	
A 2	I	940	42,5	35,0	27,5	15,0	12,5	7,5	2,5	
B 1	I	940	42,5	32,5	22,5	17,5	10,0	5,0	2,5	
B 2	I	940	40,0	37,5	27,5	17,5	10,0	5,0	0,0	
C 1	I	940	45,0	37,5	27,5	20,0	12,5	2,5	0,0	
C 2	I	940	42,5	37,5	30,0	20,0	12,5	5,0	0,0	
D 1	I	940	45,0	40,0	27,5	27,5	15,0	10,0	2,5	
D 2	I	940	47,5	40,0	27,5	15,0	10,0	7,5	0,0	
$\bar{x}$	I	940	43,4	36,9	25,6	18,8	11,3	5,6	0,9	
A 1	II	940	50,0	40,0	32,5	12,5	10,0	2,5	0,0	
A 2	II	940	50,0	40,0	30,0	22,5	10,0	5,0	0,0	
B 1	II	940	50,0	42,5	27,5	15,0	7,5	2,5	0,0	
B 2	II	940	45,0	40,0	30,0	22,5	10,0	2,5	0,0	
C 1	II	940	47,5	40,0	37,5	17,5	7,5	2,5	0,0	
C 2	II	940	50,0	40,0	35,0	22,5	7,5	5,0	0,0	
D 1	II	940	52,5	45,0	40,0	25,0	15,0	5,0	2,5	
D 2	II	940	50,0	42,5	32,5	17,5	10,0	2,5	0,0	
$\bar{x}$	II	940	49,4	41,2	33,1	18,4	9,7	3,4	0,3	

Tabelle 11: Fortsetzung

Misch- ejakulat	Ver- dünnen	RZB (g)	Versuchszeit nach Zentrifugation (min)						
			0	10	20	30	40	50	60
A 1	I	1060	42,5	35,0	27,5	12,5	7,5	2,5	0,0
A 2	I	1060	40,0	35,0	22,5	17,5	10,0	2,5	0,0
B 1	I	1060	40,0	32,5	25,0	17,5	7,5	2,5	0,0
B 2	I	1060	40,0	35,0	20,0	12,5	7,5	5,0	0,0
C 1	I	1060	40,0	35,0	25,0	17,5	7,5	2,5	0,0
C 2	I	1060	40,0	32,5	25,0	12,5	10,0	5,0	0,0
D 1	I	1060	45,0	37,5	27,5	17,5	10,0	2,5	0,0
D 2	I	1060	40,0	35,0	25,0	15,0	10,0	5,0	0,0
$\bar{x}$	I	1060	40,9	34,7	24,7	15,3	8,8	3,4	0,0
A 1	II	1060	47,5	37,5	27,5	17,5	7,5	2,5	0,0
A 2	II	1060	42,5	40,0	27,5	15,0	7,5	2,5	0,0
B 1	II	1060	45,0	35,0	25,0	10,0	5,0	0,0	0,0
B 2	II	1060	42,5	35,0	25,0	12,5	7,5	2,5	0,0
C 1	II	1060	47,5	40,0	35,0	17,5	7,5	2,5	0,0
C 2	II	1060	45,0	37,5	30,0	15,0	5,0	0,0	0,0
D 1	II	1060	45,0	40,0	22,5	20,0	5,0	2,5	0,0
D 2	II	1060	42,5	37,5	27,5	20,0	10,0	2,5	0,0
$\bar{x}$	II	1060	44,7	37,8	26,3	15,9	6,9	1,9	0,0
A 1	I	1250	40,0	30,0	27,5	15,0	10,0	2,5	0,0
A 2	I	1250	40,0	32,5	22,5	12,5	7,5	0,0	0,0
B 1	I	1250	37,5	30,0	22,5	15,0	2,5	2,5	0,0
B 2	I	1250	37,5	35,0	22,5	12,5	10,0	2,5	0,0
C 1	I	1250	35,0	30,0	22,5	12,5	7,5	2,5	0,0
C 2	I	1250	37,5	32,5	22,5	10,0	2,5	0,0	0,0
D 1	I	1250	40,0	37,5	25,0	12,5	5,0	0,0	0,0
D 2	I	1250	40,0	30,0	25,0	12,5	7,5	2,5	0,0
$\bar{x}$	I	1250	38,4	32,2	23,8	12,8	6,6	1,6	0,0
A 1	II	1250	42,5	37,5	27,5	10,0	2,5	0,0	0,0
A 2	II	1250	42,5	32,5	20,0	7,5	7,5	2,5	0,0
B 1	II	1250	40,0	32,5	22,5	7,5	2,5	0,0	0,0
B 2	II	1250	42,5	30,0	22,5	7,5	2,5	0,0	0,0
C 1	II	1250	45,0	37,5	27,5	12,5	2,5	0,0	0,0
C 2	II	1250	40,0	32,5	30,0	7,5	2,5	0,0	0,0
D 1	II	1250	42,5	37,5	25,0	12,5	5,0	0,0	0,0
D 2	II	1250	42,5	37,5	22,5	12,5	7,5	0,0	0,0
$\bar{x}$	II	1250	42,2	34,7	24,7	9,1	4,1	0,3	0,0

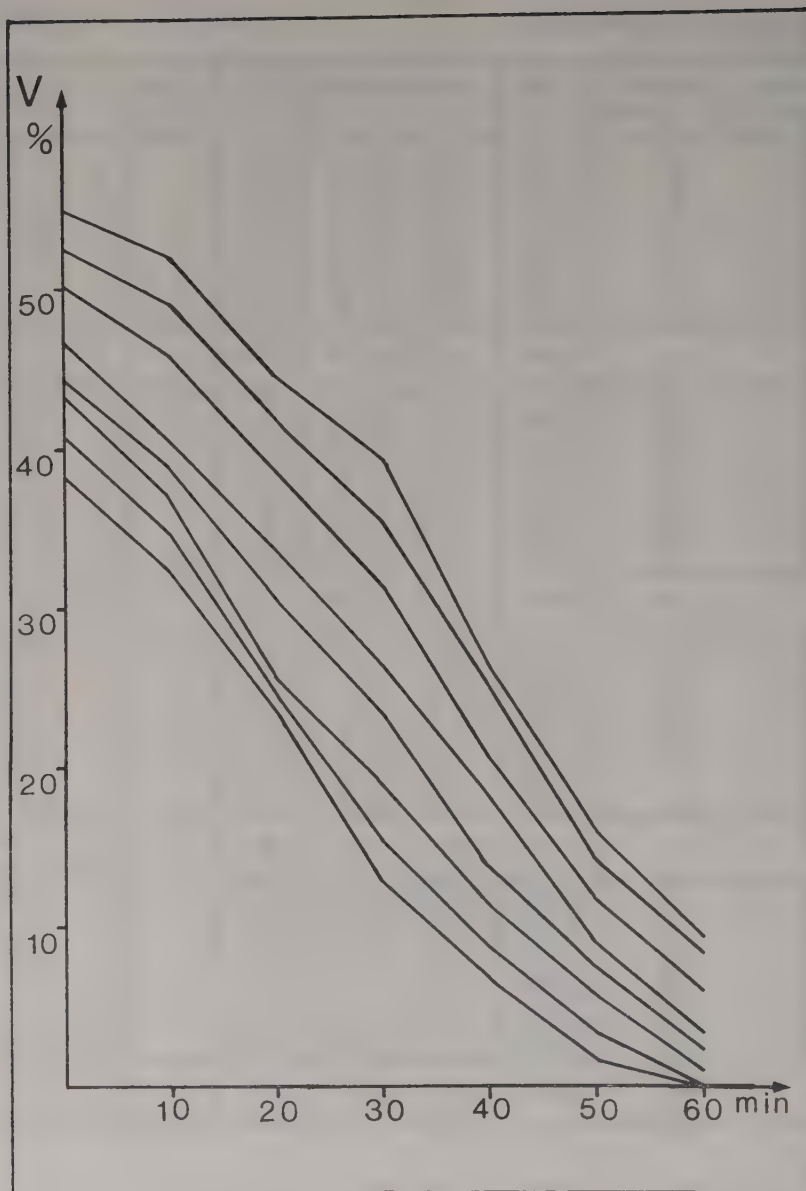


Abb. 7: Abfall der Spermienmotilität (V %) in der Zeit bis zu einer Stunde nach Ende der Zentrifugation (Verdünnung I; Mittelwerte aus Tabelle 11). Jeder dieser Kurven steht für eine Zentrifugalbeschleunigung. Diese nimmt von oben nach unten zu (280 g, 440 g, 540 g, 670 g, 820 g, 940 g, 1060 g, 1250 g).

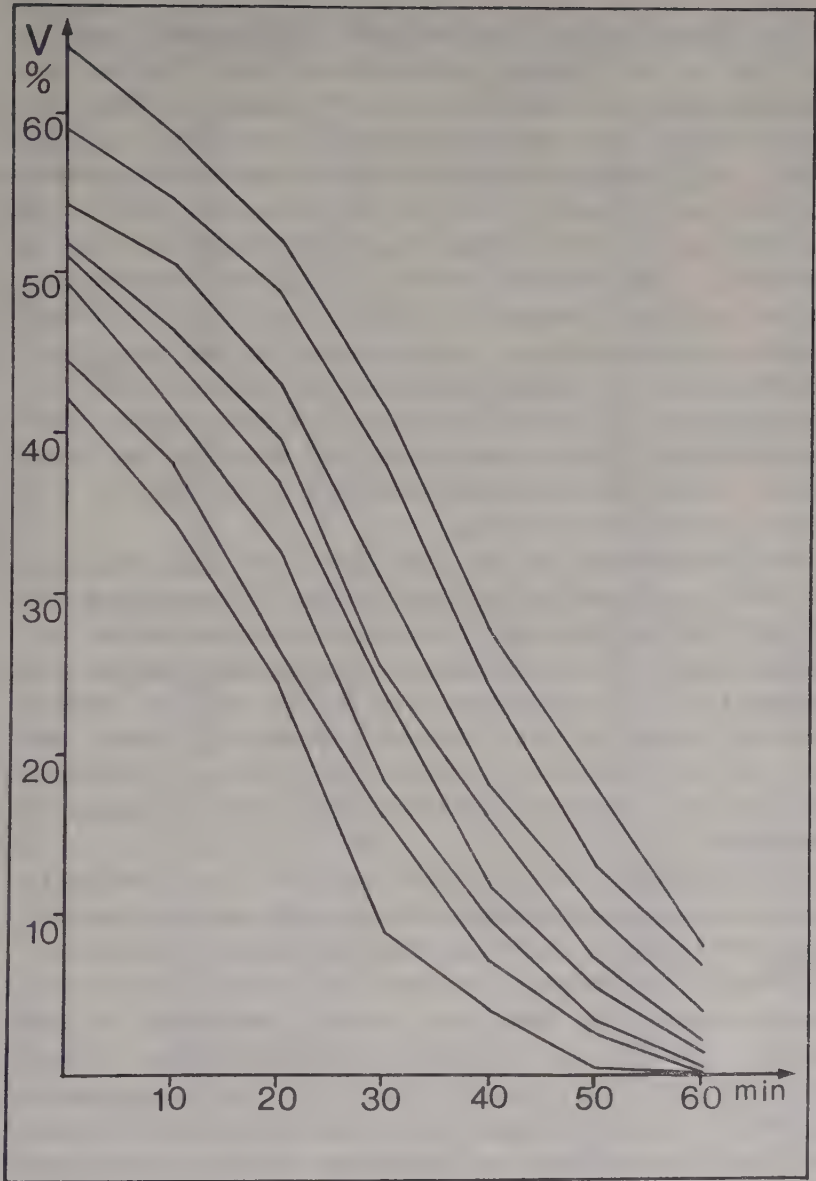


Abb. 8: Abfall der Spermienmotilität (V %) in der Zeit bis zu einer Stunde nach Ende der Zentrifugation (Verdüner II; Mittelwerte aus Tabelle 11). Jeder dieser Kurven steht für eine Zentrifugalbeschleunigung. Diese nimmt von oben nach unten zu (280 g, 440 g, 540 g, 670 g, 820 g, 940 g, 1060 g, 1250 g).

Aus den grafischen Darstellungen (Abbildungen 7 und 8) und den in der Tabelle 11 aufgeführten Mittelwerten der Spermienmotilität wird deutlich, daß unmittelbar nach der Zentrifugation die Spermienmotilität im Verdünner II bei jeder Zentrifugationsstufe in den ersten 30 Minuten größer ist als im Verdünner I. Von der 40. Minute an lagen die Motilitätswerte im Verdünner I dann geringfügig über den im Verdünner II beobachteten Werten. Wie in den Vorversuchen konnte auch hier festgestellt werden, daß mit steigender Zentrifugalbeschleunigung die Spermienmotilität bereits unmittelbar nach der Zentrifugation stärker abfällt. Mit der Zentrifugation beginnend fällt dann über den gesamten Versuchszeitraum die Spermienmotilität kontinuierlich ab. Dies trifft sowohl für die Spermienbewegung im Verdünner I wie auch im zweiten Verdünner zu.

Um eine Aussage über die Auswirkung der Zentrifugation auf die Spermienmotilität unter Berücksichtigung aller in diesem Abschnitt gemachten Versuche zu erhalten, wurde die Fläche unter dem Kurvenverlauf (Abbildungen 7 und 8) als Maßzahl für die Motilität bis zu 60 Minuten nach der Zentrifugation errechnet. Über diese Flächenmaßzahlen (FMZ) war der direkte Vergleich zwischen den beiden Verdünnern möglich. Die errechneten Flächenmaßzahlen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

In Abbildung 9 sind für jeden Verdünner die Mittelwerte der Flächenmaßzahlen und ihre Standardabweichungen, getrennt nach Zentrifugationsstufen, grafisch dargestellt. Der Signifikanztest (WELCH-Test) erbrachte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ bei der Zentrifugation des Spermas mit einer RZB von 280 g einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Verdünnern. Wie die Befruchtungsergebnisse im Versuchsabschnitt II und später in IV zeigen, ist eine Zentrifugation des Spermas nur im Bereich von 680-1080 g relevant. In diesem Bereich liegen keinen signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verdünnern vor.

Tabelle 12: Flächenmaßzahlen (FMZ) berechnet aus den Spermienmotilitätskurven bis zu 60 Minuten nach der Zentrifugation bei acht verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen (RZB)

Misch-ejakulat	RZB (g)	FMZ Verd. I	$\pm s$	FMZ Verd. II	$\pm s$
A 1	280	36,04		39,58	
A 2	280	35,00		39,58	
B 1	280	34,58		34,38	
B 2	280	33,33		36,67	
C 1	280	34,58		37,50	
C 2	280	32,92		37,50	
D 1	280	37,50		39,17	
D 2	280	36,46		41,67	
$\bar{x}$	280	35,05	1,55	38,26	2,23
A 1	440	35,21		39,17	
A 2	440	33,54		37,50	
B 1	440	30,63		31,67	
B 2	440	31,46		30,63	
C 1	440	31,25		34,38	
C 2	440	28,54		34,58	
D 1	440	33,33		36,88	
D 2	440	35,42		36,04	
$\bar{x}$	440	32,42	2,37	35,10	2,90
A 1	540	30,21		29,17	
A 2	540	28,33		30,21	
B 1	540	26,04		27,29	
B 2	540	31,46		27,71	
C 1	540	28,33		30,00	
C 2	540	26,67		29,17	
D 1	540	31,25		33,75	
D 2	540	30,00		33,96	
$\bar{x}$	540	29,04	2,02	30,16	2,49
A 1	670	25,00		26,67	
A 2	670	23,33		25,63	
B 1	670	23,75		23,33	
B 2	670	25,83		24,38	
C 1	670	26,04		27,92	
C 2	670	24,79		28,33	
D 1	670	27,50		28,54	
D 2	670	26,67		29,58	
$\bar{x}$	670	25,37	1,42	26,80	2,19

Tabelle 12: Fortsetzung

Misch- ejakulat	RZB (g)	FMZ Verd. I	$\pm$ s	FMZ Verd. II	$\pm$ s
A 1	820	22,29		23,13	
A 2	820	21,25		24,38	
B 1	820	22,29		22,92	
B 2	820	22,92		25,42	
C 1	820	22,29		24,38	
C 2	820	24,38		23,75	
D 1	820	23,33		27,71	
D 2	820	24,17		26,04	
$\bar{x}$	820	22,87	1,06	24,71	1,61
A 1	940	18,13		20,42	
A 2	940	20,00		22,08	
B 1	940	18,33		20,00	
B 2	940	19,58		21,25	
C 1	940	20,42		21,46	
C 2	940	21,04		22,50	
D 1	940	23,96		26,25	
D 2	940	20,63		21,67	
$\bar{x}$	940	20,26	1,82	21,95	1,92
A 1	1060	17,71		19,38	
A 2	1060	17,92		18,96	
B 1	1060	17,50		16,25	
B 2	1060	16,67		17,29	
C 1	1060	17,92		21,04	
C 2	1060	17,50		18,33	
D 1	1060	19,58		18,75	
D 2	1060	18,33		19,79	
$\bar{x}$	1060	17,89	0,84	18,72	1,48
A 1	1250	17,50		16,46	
A 2	1250	15,83		15,21	
B 1	1250	15,21		14,17	
B 2	1250	16,88		13,96	
C 1	1250	15,42		17,08	
C 2	1250	14,38		15,42	
D 1	1250	16,67		16,88	
D 2	1250	16,25		16,88	
$\bar{x}$	1250	16,02	1,01	15,76	1,25

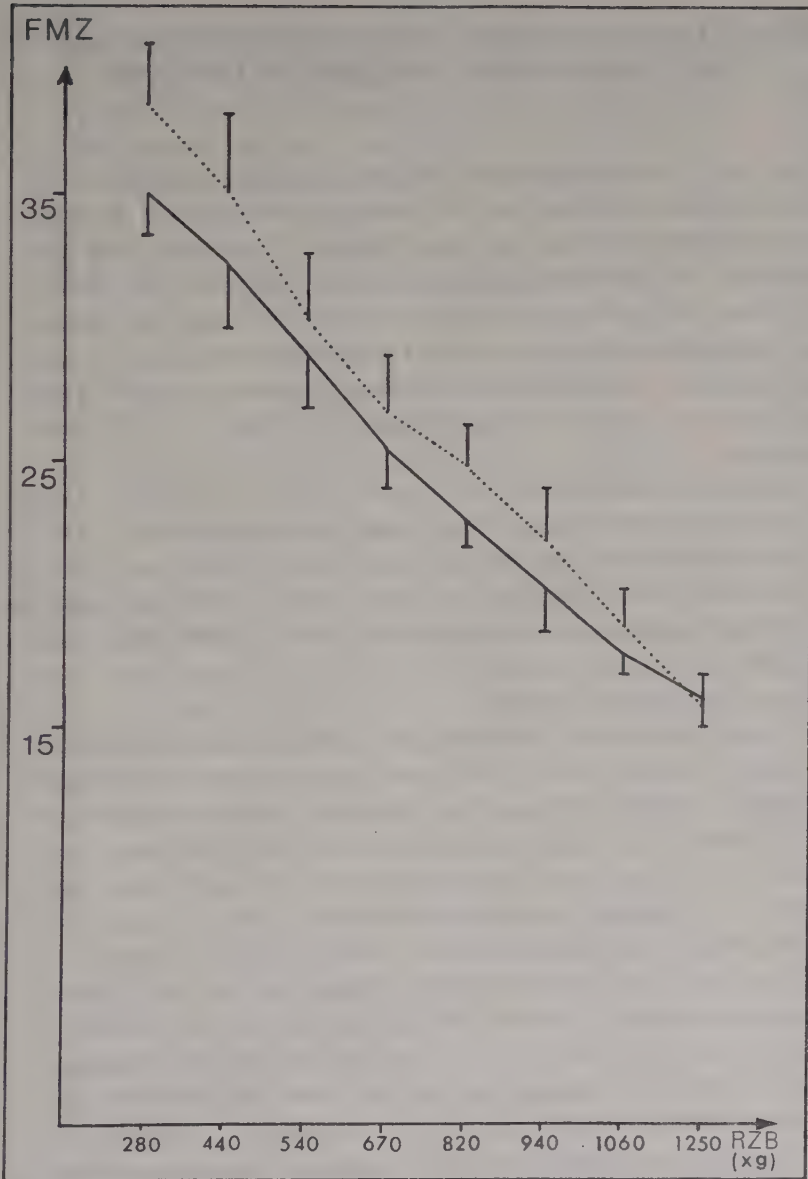


Abb. 9: Flächenmaßzahlen (FMZ) für beide Verdünner entsprechend den in der Tabelle 12 aufgeführten Mittelwerten mit Standardabweichungen (RZB = Relative Zentrifugalbeschleunigung) (Verdünner I —; Verdünner II

3.2.2.4 Tiefe intravaginale Insemination nach Entfernung des Glycerins durch Zentrifugation (Versuchsabschnitt IV)

In dem Versuchsabschnitt IV erfolgte ein Vergleich der Befruchtungsergebnisse, die mit Hahnensperma, in den Verdünnern I und II verdünnt, erzielt wurden. Die Entfernung des Glycerins aus den Samenverdünnungen erfolgte vor der Besamung bei +5°C durch Zentrifugation über 15 Minuten, wobei acht verschiedene Relative Zentrifugalbeschleunigungen angewandt wurden. Aus arbeitstechnischen Gründen erfolgte eine Aufgliederung dieses Versuchsabschnittes in vier Teilabschnitte:

1. Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 280 bzw. 820 g,
 2. Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 440 bzw. 920 g,
 3. Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 550 bzw. 1080 g,
 4. Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 680 bzw. 1250 g.
- Zum Einsatz kamen nur Mischejakulate, die in Spermiendichte, Motilität vor der Tiefgefrierung und Motilität nach dem Auftauen gleichwertig waren.

Um den Einfluß des Glycerins auf die Besamungsergebnisse deutlich zu machen, erfolgten jeweils Besamungen mit Tiefgefrierspema ohne Entfernung des Glycerins sowie vergleichend mit Frischsperma, das im Verhältnis 1:2 verdünnt war und Glycerin in einer Endkonzentration von 8% enthielt. Zur Kontrolle erfolgten außerdem Besamungen mit unverdünntem Frischsperma sowie Frischsperma, das mit den Verdünnern I und II jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt worden war. Um die Unterschiedlichkeit der Befruchtungsraten für die einzelnen Tage in der Zeit vom 2.-13. Tag nach der ersten Besamung besser erkennen zu können, wurden in jedem Teilabschnitt die täglichen Befruchtungsergebnisse in Kurvenform dargestellt. Zur Glättung der Kurven wurden die kumulierenden Häufigkeiten dargestellt, da sonst die Darstellung aufgrund der großen Schwankungen innerhalb einer Kurve unübersichtlich

wäre. Zur Sichtbarmachung des Abfalls der Befruchtungspersistenz erfolgte in Abbildungen noch die Darstellung der Befruchtungsergebnisse für drei gleiche Zeitabschnitte (siehe auch Versuchsabschnitte I und II).

Im Teilabschnitt I wurde Tiefgefriersperma nach dem Auftauen mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 280 bzw. 820 g gewaschen und zur Besamung gebracht. Für diesen Besamungsversuch standen 132 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden, und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der Erstbesamung insgesamt 1095 Eier legten. Die spermatologischen Befunde sowie die Motilität der Spermien vor und nach der Tiefgefrierung sind in der Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Spermatologische Befunde der drei zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung

Mischejakulate	A	B	C
Spermienmenge (ml)	10,5	10,0	11,0
Spermiendichte (Mio. pro mm ³)	4,0	3,9	4,1
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90,0	90,0	90,0
nach dem Auftauen			
im Verdünner I	66,6	65,0	53,3
im Verdünner II	73,3	70,0	70,0

In der Tabelle 14 sind die Befruchtungsergebnisse einschließlich der Kontrolle mit Frischsperma, unverdünnt und mit den verschiedenen Zusätzen versehen, dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 820 g entfernt

Tabelle 14: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma ohne Entfernung bzw. nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 280 g und 820 g und mit Frischsperma mit verschiedenen Zusätzen

verwendetes Sperma, Verdünner	Glycerin-entfernung (RZB)	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
		2.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	2.-5. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	6.-9. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	10.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$
TG I	280 g	$\frac{99}{4}(4,0)$	$\frac{33}{2}(6,1)$	$\frac{29}{2}(6,9)$	$\frac{37}{0}$
TG II	280 g	$\frac{101}{9}(8,9)$	$\frac{35}{4}(11,4)$	$\frac{32}{4}(12,5)$	$\frac{34}{1}(2,9)$
TG I	820 g	$\frac{89}{23}(25,8)$	$\frac{28}{11}(39,3)$	$\frac{30}{10}(33,3)$	$\frac{31}{2}(6,5)$
TG II	820 g	$\frac{91}{29}(31,9)$	$\frac{30}{13}(43,3)$	$\frac{29}{12}(41,4)$	$\frac{32}{4}(12,5)$
TG I	---	$\frac{97}{2}(2,1)$	$\frac{34}{2}(5,9)$	$\frac{35}{0}$	$\frac{28}{0}$
TG II	---	$\frac{98}{6}(6,1)$	$\frac{32}{3}(9,4)$	$\frac{31}{3}(9,7)$	$\frac{35}{0}$
frisch + 8% Gly. I	---	$\frac{93}{5}(5,4)$	$\frac{29}{4}(13,8)$	$\frac{32}{1}(3,1)$	$\frac{32}{0}$
frisch + 8% Gly. II	---	$\frac{103}{12}(11,7)$	$\frac{32}{6}(18,8)$	$\frac{34}{5}(14,7)$	$\frac{37}{1}(2,7)$
frisch I	---	$\frac{108}{67}(62,0)$	$\frac{32}{26}(81,3)$	$\frac{35}{25}(71,4)$	$\frac{41}{16}(39,0)$
frisch II	---	$\frac{107}{74}(69,2)$	$\frac{36}{28}(77,8)$	$\frac{35}{27}(77,1)$	$\frac{36}{19}(52,8)$
frisch unverdünnt	---	$\frac{109}{91}(83,5)$	$\frac{37}{31}(83,8)$	$\frac{40}{35}(87,5)$	$\frac{32}{25}(78,1)$

$\frac{E}{B} = \frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$

TG = Tiefgefriersperma

worden war, Befruchtungsergebnisse von 25,8 bzw. 31,9% erzielt werden konnten. Zentrifugationen mit einer RZB von 280 g erbrachten mit 4,0 bzw. 8,9% wesentlich schlechtere Ergebnisse. Sie lagen sogar nur in dem Bereich, in dem Befruchtungsergebnisse mit unzentrifugierten Samenverdünnungen erreicht werden konnten (2,1 bzw. 6,1%).

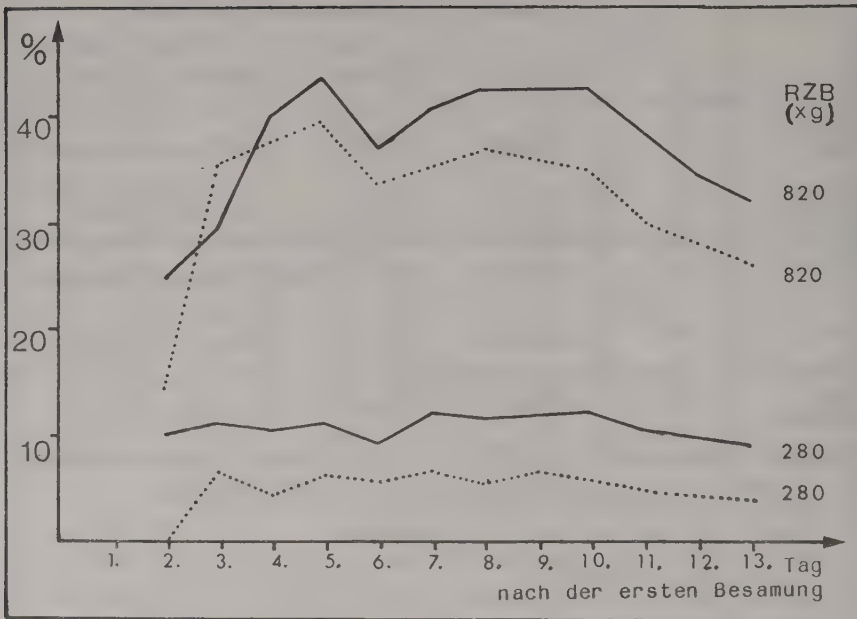


Abb. 10: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 280 bzw. 820 g (Verdüner I; Verdüner II —)

Basierend auf den in Tabelle 14 aufgeführten Werten sind diese Befruchtungsergebnisse in Abbildung 10 in Kurvenform und in Abbildung 11 säulengrafisch wiedergegeben. Die Ergebnisse mit dem Verdünner II sind bei beiden Zentrifugalbeschleunigungen denen im Verdünner I deutlich überlegen. Die Befruchtungsergebnisse lagen im Verdünner II bei Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 820 g bis zum 10. Tag des Untersuchungszeitraums auf über 40% (im Verdünner I bei 35%). Nach dem 11. Tag sank das Befruchtungsergebnis auf 31,9% ab.

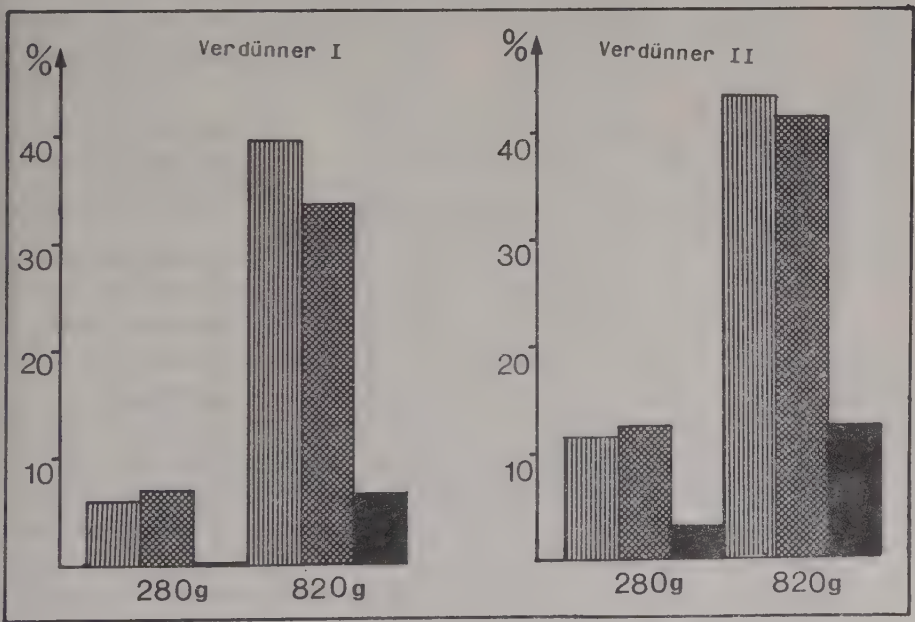


Abb. 11: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 280 bzw. 820 g

2.-5. Tag nach der ersten Besamung 
6.-9. Tag nach der ersten Besamung 
10.-13. Tag nach der ersten Besamung 

Auch aus dieser Säulengrafik ist unschwer zu erkennen, daß die Befruchtungsergebnisse mit dem Verdünner II denen, die mit dem Verdünner I erzielt wurden, deutlich überlegen sind. Es ist jedoch auch zu erkennen, daß die Befruchtungspersistenz in beiden Verdünnern 9 Tage nach der Erstbesamung bzw. 4 Tage nach der Drittbesamung soweit abnahm, daß von diesem Zeitpunkt an nur noch sporadisch befruchtete Eier gelegt wurden (insgesamt 7 Eier).

Im Teilabschnitt II wurde Tiefgefriersperma nach dem Auftauen mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 440 bzw. 920 g gewaschen und zur Besamung gebracht. Für diesen Besamungsversuch standen 132 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der Erstbesamung insgesamt 1083 Eier legten. Die spermatologischen Befunde sowie die Motilität der Spermien vor und nach der Tiefgefrierung sind in der Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Spermatologische Befunde der drei zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung

Mischejakulate	A	B	C
Spermienmenge (ml)	9,8	9,2	10,0
Spermiendichte (Mio. pro mm ³)	3,90	4,15	4,05
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90,0	90,0	90,0
nach dem Auftauen			
im Verdünner I	63,3	65,0	65,0
im Verdünner II	70,0	71,7	68,3

In der Tabelle 16 sind die Befruchtungsergebnisse einschließlich der Kontrollen mit Frischsperma, unverdünnt und mit den verschiedenen Zusätzen versehen, dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 920 g entfernt worden war, Befruchtungsergebnisse von 18,7 bzw. 27,0% erzielt werden konnten. Zentrifugationen mit einer RZB von 440 g erbrachten nur Ergebnisse, die bei 10% lagen.

Tabelle 16: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma ohne Entfernung bzw. nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 440 g und 920 g und mit Frischsperma mit verschiedenen Zusätzen

verwendetes Sperma, Verdüner	Glycerin- entfer- nung (RZB)	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
		2.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	2.-5. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	6.-9. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	10.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$
TG I	440 g	$\frac{92}{9}(9,8)$	$\frac{32}{4}(12,5)$	$\frac{35}{4}(11,4)$	$\frac{25}{1}(4,0)$
TG II	440 g	$\frac{93}{9}(9,7)$	$\frac{36}{4}(11,1)$	$\frac{31}{4}(12,9)$	$\frac{26}{1}(3,8)$
TG I	920 g	$\frac{91}{17}(18,7)$	$\frac{30}{8}(26,7)$	$\frac{33}{9}(27,3)$	$\frac{28}{0}$
TG II	920 g	$\frac{89}{24}(27,0)$	$\frac{30}{12}(40,0)$	$\frac{34}{10}(29,4)$	$\frac{25}{2}(8,0)$
TG I	---	$\frac{108}{6}(5,6)$	$\frac{35}{2}(5,7)$	$\frac{39}{4}(10,3)$	$\frac{34}{0}$
TG II	---	$\frac{109}{3}(2,8)$	$\frac{41}{3}(7,3)$	$\frac{34}{0}$	$\frac{34}{0}$
frisch + 8% Gly. I	---	$\frac{98}{8}(8,2)$	$\frac{36}{5}(13,9)$	$\frac{35}{3}(8,6)$	$\frac{27}{0}$
frisch + 8% Gly. II	---	$\frac{95}{10}(10,5)$	$\frac{35}{5}(14,3)$	$\frac{30}{5}(16,7)$	$\frac{30}{0}$
frisch I	---	$\frac{96}{33}(55,2)$	$\frac{35}{24}(68,6)$	$\frac{30}{16}(53,3)$	$\frac{31}{13}(41,9)$
frisch II	---	$\frac{98}{60}(61,2)$	$\frac{35}{23}(65,7)$	$\frac{36}{24}(66,7)$	$\frac{27}{13}(48,1)$
frisch unverdünt	---	$\frac{94}{78}(83,0)$	$\frac{37}{32}(86,5)$	$\frac{30}{25}(83,3)$	$\frac{27}{21}(77,8)$

$\frac{E}{B}$ = $\frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$

TG = Tiefgefriersperma

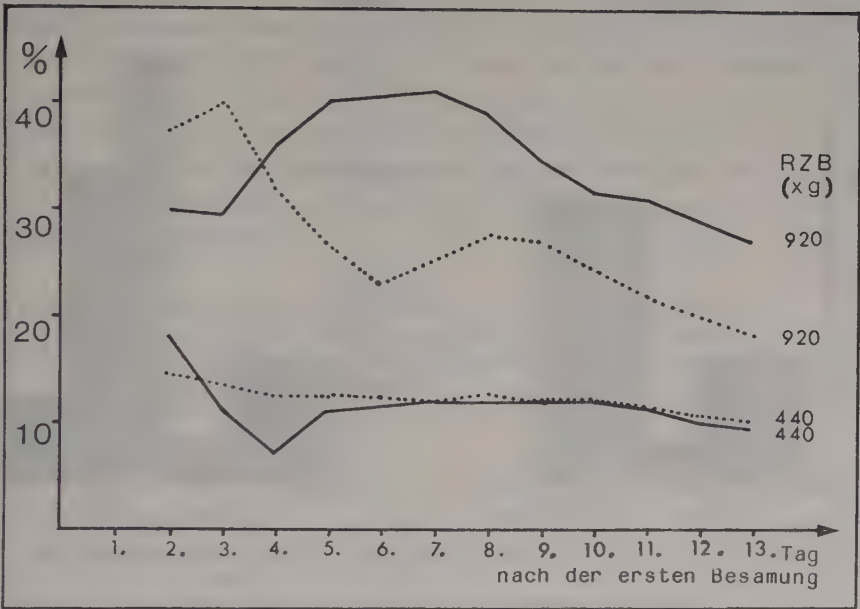


Abb. 12: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 440 bzw. 920 g (Verdüner I; Verdüner II ———)

Basierend auf den in Tabelle 16 aufgeführten Werten sind die Befruchtungsergebnisse, die mit Tiefgefriersperma erzielt wurden, dem das Glycerin durch Zentrifugation vor der Besamung entfernt worden war, in Abbildung 12 in Kurvenform und in Abbildung 13 säulengrafisch wiedergegeben. Vor allem mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin mit einer RZB von 920 g entfernt worden war, sind im Verdüner II deutlich bessere Ergebnisse erzielt worden als im Verdüner I. Im Verdüner II lag das Befruchtungsergebnis in der Zeit vom 4.-9. Tag nach der Erstbesamung bei 40%, während es im Verdüner I nur unter 30% lag.

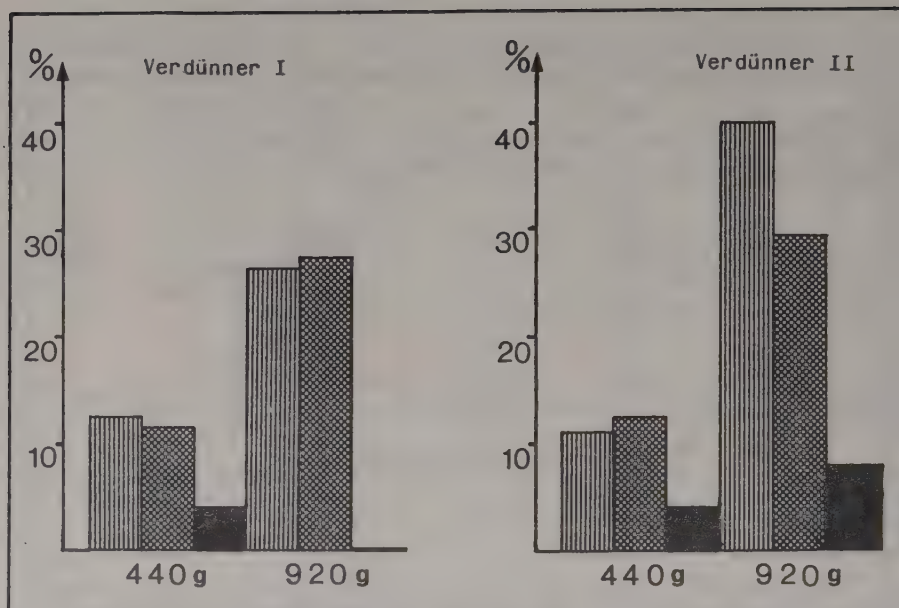


Abb. 13: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 440 bzw. 920 g

2.-5. Tag nach der ersten Besamung 
 6.-9. Tag nach der ersten Besamung 
 10.-13. Tag nach der ersten Besamung 

In der Säulengrafik sind die Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins durch Zentrifugation in drei gleichen Zeiträumen dargestellt. Es wird sehr deutlich, daß die Befruchtungspersistenz nur bis zum 4. Tag nach der letzten Besamung (9. Tag nach Erstbesamung) anhält. In der Zeit vom 5.-8. Tag nach der letzten Besamung wurden in diesem Sperma nur noch vier befruchtete Eier gelegt. In diesem Zeitraum wurde also nie ein Befruchtungsergebnis von 10% erreicht.

Im Teilabschnitt III wurde Tiefgefriersperma nach dem Auftauen mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 550 bzw. 1080 g gewaschen und zur Besamung gebracht. Für diesen Besamungsversuch standen 132 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der Erstbesamung insgesamt 1069 Eier legten. Die spermatologischen Befunde sowie die Motilität der Spermien vor und nach der Tiefgefrierung sind in der Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Spermatologische Befunde der drei zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung

Mischejakulate	A	B	C
Spermienmenge (ml)	9,8	9,4	9,4
Spermiendichte ₃ (Mio. pro mm ³)	3,95	3,90	4,00
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90,0	90,0	90,0
nach dem Auftauen			
im Verdünner I	65,0	63,3	65,0
im Verdünner II	70,0	70,0	70,0

In der Tabelle 18 sind die Befruchtungsergebnisse einschließlich der Kontrollen mit Frischsperma, unverdünnt und mit den verschiedenen Zusätzen versehen, dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 1080 g entfernt worden war, Befruchtungsergebnisse von 17,4 bzw. 25,9% erzielt werden konnten. Zentrifugationen mit einer RZB von

Tabelle 18: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma ohne Entfernung bzw. nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 550 g und 1080 g und mit Frischsperma mit verschiedenen Zusätzen

verwendetes Sperma, Verdünner	Glycerin-entfernung (RZB)	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
		2.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	2.-5. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	6.-9. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	10.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$
TG I	550 g	$\frac{97}{16}(16,5)$	$\frac{28}{6}(21,4)$	$\frac{35}{6}(17,1)$	$\frac{34}{4}(11,8)$
TG II	550 g	$\frac{90}{13}(14,4)$	$\frac{29}{6}(20,7)$	$\frac{30}{7}(23,3)$	$\frac{31}{0}$
TG I	1080 g	$\frac{92}{16}(17,4)$	$\frac{25}{6}(24,0)$	$\frac{31}{8}(25,8)$	$\frac{36}{2}(5,6)$
TG II	1080 g	$\frac{85}{22}(25,9)$	$\frac{28}{10}(35,7)$	$\frac{29}{9}(31,0)$	$\frac{28}{3}(10,7)$
TG I	---	$\frac{103}{9}(8,7)$	$\frac{35}{3}(8,6)$	$\frac{35}{5}(14,3)$	$\frac{33}{1}(3,0)$
TG II	---	$\frac{96}{10}(10,4)$	$\frac{32}{6}(18,8)$	$\frac{31}{4}(12,9)$	$\frac{33}{0}$
frisch + 8% Gly. I	---	$\frac{101}{13}(12,9)$	$\frac{34}{6}(17,6)$	$\frac{35}{5}(14,3)$	$\frac{32}{2}(6,3)$
frisch + 8% Gly. II	---	$\frac{96}{7}(7,3)$	$\frac{30}{5}(16,7)$	$\frac{32}{2}(6,3)$	$\frac{34}{0}$
frisch I	---	$\frac{109}{66}(60,6)$	$\frac{37}{28}(75,7)$	$\frac{38}{25}(65,8)$	$\frac{34}{13}(38,2)$
frisch II	---	$\frac{99}{62}(62,6)$	$\frac{36}{24}(66,7)$	$\frac{34}{26}(76,5)$	$\frac{29}{12}(41,4)$
frisch unverdünnt	---	$\frac{101}{80}(78,2)$	$\frac{33}{26}(78,8)$	$\frac{35}{28}(80,0)$	$\frac{33}{26}(78,8)$

$\frac{E}{B}$ = $\frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$

TG = Tiefgefriersperma

550 g erbrachten nur Ergebnisse, die bei 15% lagen. Relativ hoch mit 8,7 bzw. 10,4% waren in diesem Abschnitt die Befruchtungsergebnisse, die mit glycerinhaltigem Tiefgefriersperma erzielt werden konnten.

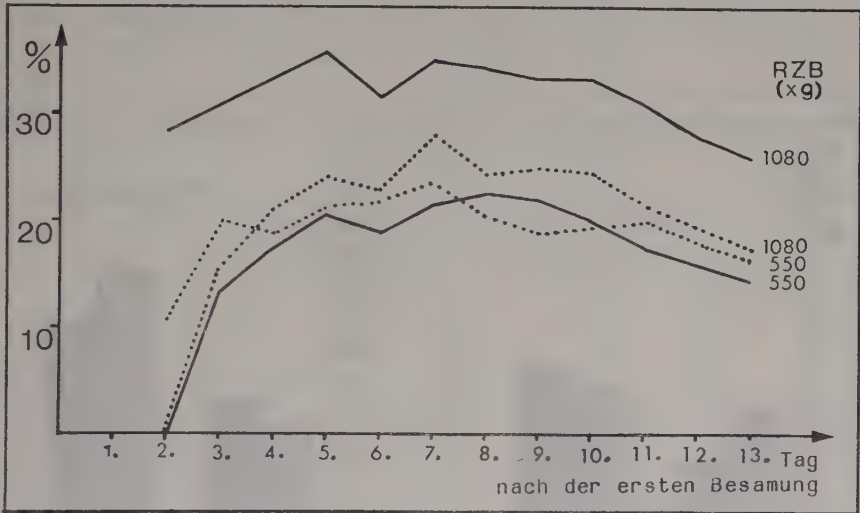


Abb. 14: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 550 bzw. 1080 g (Verdüner I; Verdüner II ———)

Basierend auf den in Tabelle 18 aufgeführten Werten sind die Befruchtungsergebnisse, die mit Tiefgefriersperma erzielt wurden, dem das Glycerin durch Zentrifugation vor der Besamung entfernt worden war, in Abbildung 14 in Kurvenform und in Abbildung 15 säulengrafisch wiedergegeben.

Die besten Ergebnisse wurden mit Tiefgefriersperma erzielt, dem das Glycerin mit einer RZB von 1080 g entfernt worden war, wobei hier der Verdüner II dem Verdüner I überlegen war (25,9 und 17,4% bzw. für den gesamten Zeitraum

bis zum 9. Tag nach der Erstbesamung 33,3 und 25,0%). Bei Zentrifugation mit 550 g war mit dem Verdünnner I ein besseres Ergebnis zu erreichen. Hier war der Abfall der Befruchtungspersistenz auch nicht so stark.

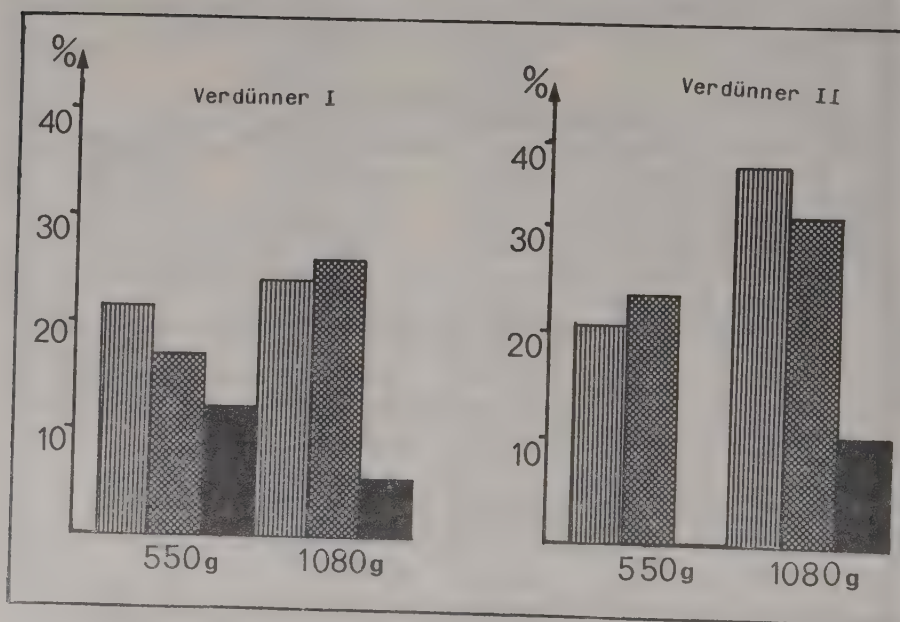


Abb. 15: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 550 bzw. 1080 g

2.-5. Tag nach der ersten Besamung (vertikal gestreift)

6.-9. Tag nach der ersten Besamung (gepunktet)

10.-13. Tag nach der ersten Besamung (schwarz)

In der Säulengrafik sind die Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins durch Zentrifugation in drei gleichen Zeiträumen dargestellt. Auch

hier wird der Abfall der Befruchtungspersistenz in der Zeit nach dem 9. Tag nach der Erstbesamung deutlich. In dem Zeitraum vom 10.-13. Tag nach der Erstbesamung wurden nur noch 9 befruchtete Eier gelegt, wobei im Verdünner I bei Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 550 g noch ein Befruchtungsergebnis von über 10% in diesem Zeitraum erreicht werden konnte.

Im Teilabschnitt IV wurde Tiefgefriersperma nach dem Auftauen mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 680 bzw. 1250 g gewaschen und zur Besamung gebracht. Für diesen Besamungsversuch standen 132 Hennen zur Verfügung, die in Gruppengrößen von je 12 Tieren dreimal im Versuchszeitraum (1., 3. und 6. Tag) besamt wurden und die im Zeitraum vom 2.-13. Tag nach der Erstbesamung insgesamt 1014 Eier legten. Die spermatologischen Befunde sowie die Motilität der Spermien vor und nach der Tiefgefrierung sind in der Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Spermatologische Befunde der drei zum Einsatz gelangten Mischejakulate jeweils mit Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor bzw. nach der Tiefgefrierung

Mischejakulate	A	B	C
Spermienmenge (ml)	9,2	9,1	9,0
Spermiendichte (Mio. pro mm ³)	4,05	3,85	3,75
Vorwärtsbewegung in % vor Tiefgefrierung	90,0	90,0	85,0
nach dem Auftauen			
im Verdünner I	65,0	63,3	61,7
im Verdünner II	70,0	68,3	65,0

In der Tabelle 20 sind die Befruchtungsergebnisse einschließlich der Kontrollen mit Frischsperma, unverdünnt und mit den verschiedenen Zusätzen versehen, dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 680 g entfernt worden war, die besten Befruchtungsergebnisse mit 25,5 bzw. 26,2% erzielt werden konnten. Zentrifugation mit einer RZB von 1250 g erbrachten nur noch Ergebnisse von etwas mehr als 10%.

Tabelle 20: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma ohne Entfernung bzw. nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 680 g und 1250 g und mit Frischsperma mit verschiedenen Zusätzen

verwendetes Sperma, Verdüner	Glycerin- entfer- nung (RZB)	Befruchtungsergebnisse nach 1. Besamung			
		2.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	2.-5. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	6.-9. Tag $\frac{E}{B}(\%)$	10.-13. Tag $\frac{E}{B}(\%)$
TG I	680 g	$\frac{94}{24}(25,5)$	$\frac{35}{14}(40,0)$	$\frac{28}{8}(28,6)$	$\frac{31}{2}(6,5)$
TG II	680 g	$\frac{84}{22}(26,2)$	$\frac{24}{8}(33,3)$	$\frac{26}{11}(42,3)$	$\frac{34}{3}(8,8)$
TG I	1250 g	$\frac{88}{9}(10,2)$	$\frac{33}{5}(15,2)$	$\frac{30}{4}(13,3)$	$\frac{25}{0}$
TG II	1250 g	$\frac{101}{12}(11,9)$	$\frac{36}{7}(19,4)$	$\frac{29}{3}(10,3)$	$\frac{36}{2}(5,6)$
TG I	---	$\frac{81}{6}(7,4)$	$\frac{25}{2}(8,0)$	$\frac{26}{2}(7,8)$	$\frac{30}{2}(6,7)$
TG II	---	$\frac{99}{6}(6,1)$	$\frac{31}{3}(9,7)$	$\frac{36}{3}(8,3)$	$\frac{32}{0}$
frisch + 8% Gly. I	---	$\frac{85}{5}(5,9)$	$\frac{30}{3}(10,0)$	$\frac{29}{1}(3,4)$	$\frac{26}{1}(3,8)$
frisch + 8% Gly. II	---	$\frac{57}{8}(9,2)$	$\frac{30}{3}(10,0)$	$\frac{25}{3}(12,0)$	$\frac{32}{2}(6,3)$
frisch I	---	$\frac{99}{30}(50,5)$	$\frac{35}{16}(45,7)$	$\frac{31}{19}(61,3)$	$\frac{33}{15}(45,5)$
frisch II	---	$\frac{104}{67}(64,4)$	$\frac{37}{28}(75,7)$	$\frac{35}{23}(65,7)$	$\frac{32}{16}(50,0)$
frisch unverdünnt	---	$\frac{92}{67}(72,8)$	$\frac{30}{21}(70,0)$	$\frac{34}{25}(73,5)$	$\frac{28}{21}(75,0)$
$\frac{E}{B}$ = $\frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$ TG = Tiefgefriersperma					

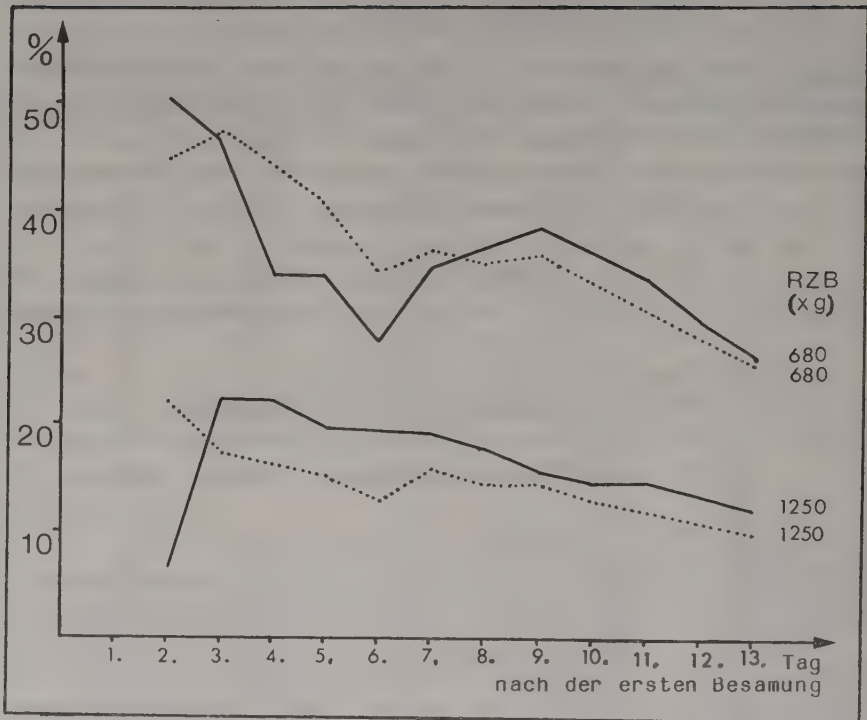


Abb. 16: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 680 bzw. 1250 g (Verdünner I; Verdünner II —)

Basierend auf den in Tabelle 20 aufgeführten Werten sind die Befruchtungsergebnisse, die mit Tiefgefriersperma erzielt wurden, dem das Glycerin durch Zentrifugation vor der Besamung entfernt worden war, in Abbildung 16 in Kurvenform und in Abbildung 17 säulengrafisch wiedergegeben. Die Ergebnisse mit dem Verdünner II sind bei beiden Zentrifugalbeschleunigungen denen im Verdünner I knapp überlegen. Der Abfall der Befruchtungspersistenz wird auch wieder sehr gut deutlich. Bis zum 9. Tag des Sammelzeitraumes betrugen die Befruchtungsergebnisse nach Entfernung des Glycerins bei

680 g (1250 g) im Verdünner I 34,9% (14,5%) und im Verdünner II 38,0% (15,4%).

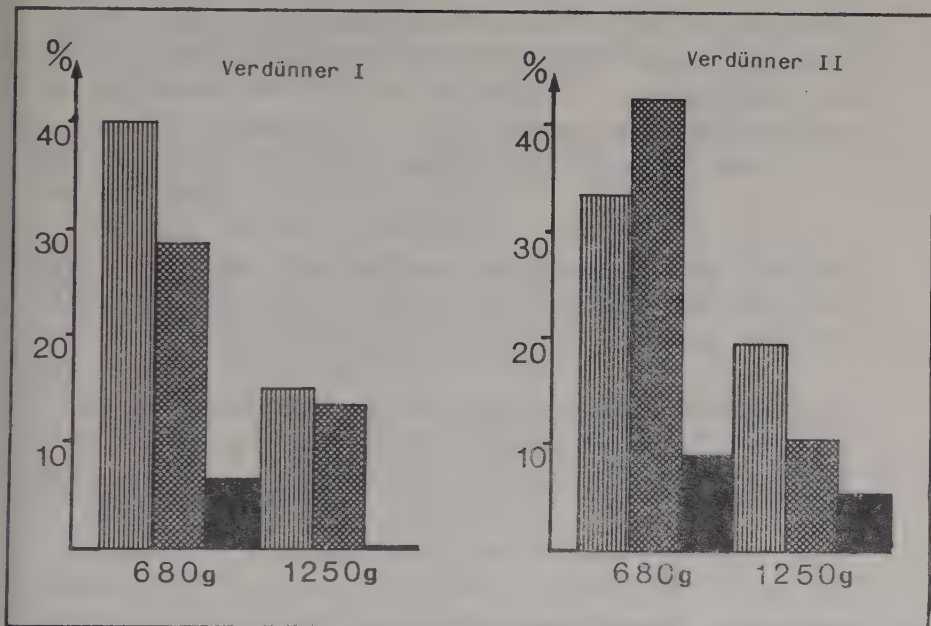


Abb. 17: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 680 bzw. 1250 g

2.-5. Tag nach der ersten Besamung
6.-9. Tag nach der ersten Besamung
10.-13. Tag nach der ersten Besamung



Auch aus dieser Säulengrafik ist unschwer zu erkennen, daß die Befruchtungsergebnisse mit dem Verdünner II denen, die mit dem Verdünner I erzielt wurden, überlegen sind. Es ist auch zu erkennen, daß die Befruchtungspersistenz in beiden Verdünnern 9 Tage nach der Erstbesamung bzw. 4 Tage

nach der Drittbesamung soweit abnahm, daß von diesem Zeitpunkt an nur noch sporadisch befruchtete Eier gelegt wurden (insgesamt 7 Eier). Es wurden also in der Zeit vom 10.-13. Tag nach der Erstbesamung nur noch Befruchtungsergebnisse von unter 10% erzielt.

In der Abbildung 18 sind zur besseren Übersicht die Befruchtungsergebnisse des Versuchsabschnittes IV, die mit Tiefgefriersperma, bei dem das Glycerin vor der Besamung durch Zentrifugation entfernt worden war, nach Zentrifugalbeschleunigungen getrennt dargestellt.

Auch aus dieser Säulengrafik ist deutlich zu erkennen, daß die Befruchtungsergebnisse mit dem Verdünner II denen, die mit dem Verdünner I erzielt wurden, überlegen sind. Es ist auch zu erkennen, daß die besten Befruchtungsergebnisse, unabhängig vom Verdünner, im RZB-Bereich von 680-1080 g zu erzielen sind.

Aus den Befruchtungsergebnissen der Gruppen, die mit glycerinhaltigem Tiefgefriersperma besamt wurden, ist ersichtlich, daß so nur Befruchtungsergebnisse von höchstens 10% erzielt werden können. Das höchste erreichte Ergebnis lag im Verdünner II bei 10,4%.

Mit Frischsperma, dem ein glycerinhaltiger Verdünner zugesetzt wurde, waren nur Befruchtungsergebnisse um 10% zu erzielen, und zwar im Verdünner I zwischen 5,4 und 12,9% und im Verdünner II zwischen 7,3 und 11,7%.

Die Befruchtungsergebnisse, die mit unverdünntem Frischsperma erzielt wurden, lagen alle bei 80%, nur im Teilabschnitt IV wurde ein sehr niedriges Ergebnis von 72,8% erreicht. In jedem Fall lagen aber die Befruchtungsergebnisse, die mit Frischsperma erzielt wurden, dem entweder der Verdünner I oder der Verdünner II zugegeben wurde, unter diesen Ergebnissen. Hiermit wurden mit Verdünner I Befruchtungsergebnisse zwischen 50,5 und 62,0% und mit Verdünner II Befruchtungsergebnisse zwischen 61,2 und 69,2% erzielt.

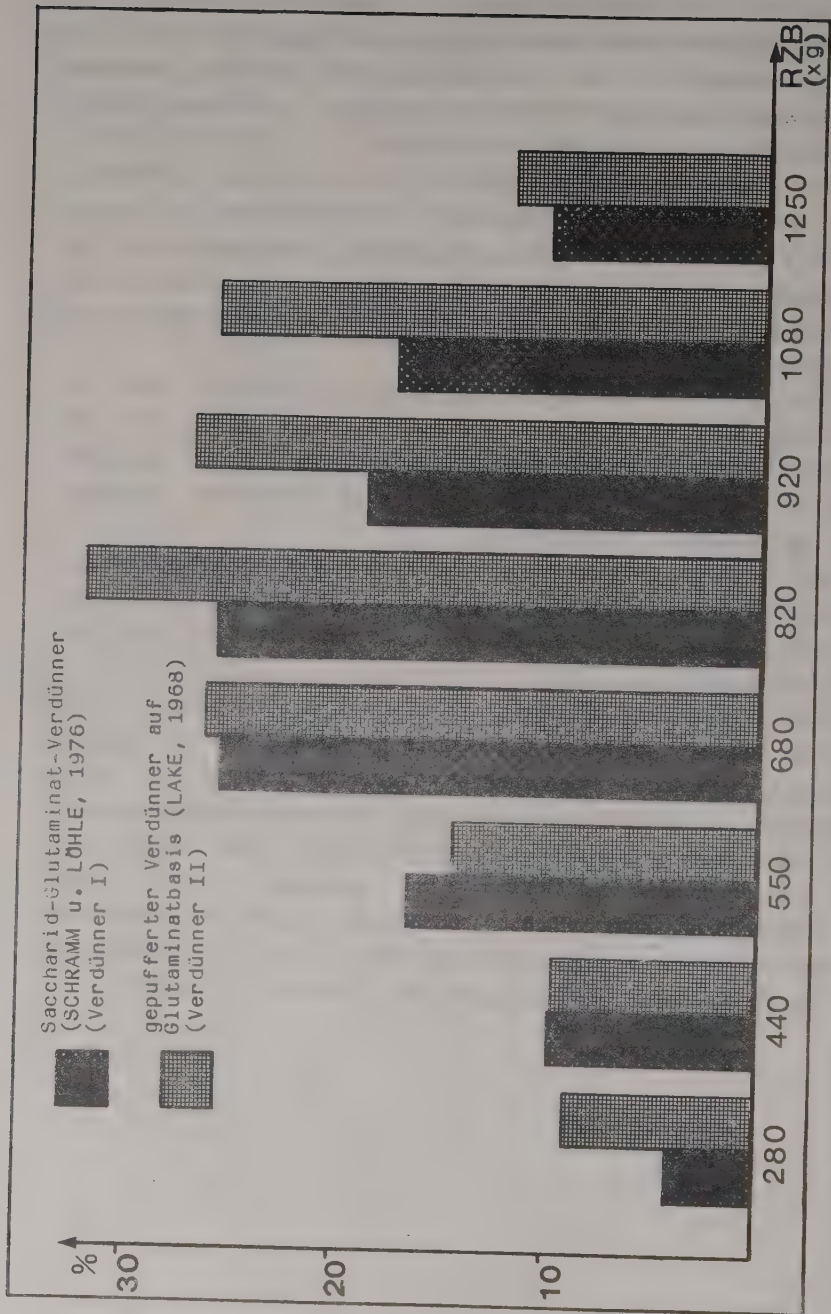


Abb. 18: Befruchtungsergebnisse des vierten Versuchsabschnittes, das mit Tiefgefriersperma erzielt wurde, dem das Glycerin vor der Besamung entfernt worden war.

Die geschätzte Varianz der Befruchtungsergebnisse dieses Abschnittes mit Tiefgefriersperma, dem das Glycerin vor der Besamung entfernt worden war, ist aus Tabelle 21 ersichtlich; die Befruchtungsergebnisse mit ihren Konfidenzbereichen sind in der Abbildung 19 grafisch dargestellt.

Danach sind im Teilabschnitt I für beide Verdüner die Befruchtungsergebnisse von 25,8 bzw. 31,9%, die mit Sperma erzielt wurden, bei dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 820 g entfernt worden war, signifikant höher als die Befruchtungsergebnisse, die mit Sperma erzielt wurden, bei dem das Glycerin nicht oder nur mit einer RZB von 280 g entfernt wurde. Beim Sperma, dem das Glycerin mit einer RZB von 820 g entzogen wurde, sind die geschätzten Standardabweichungen nach der Binomialfunktion höher als nach der Verhältnisschätzfunktion. Obwohl es in diesem Fall sicherer wäre, die Werte von 4,6 bzw. 4,9 für den Signifikanztest zugrunde zu legen, wurde davon abgesehen, da sich auch mit diesen Werten die gleiche Aussage herstellen läßt.

Im Teilabschnitt II wurde mit dem Verdüner II nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 920 g mit 25,9% ein signifikant höheres Befruchtungsergebnis erzielt als mit Sperma, dem das Glycerin nicht bzw. nur mit einer RZB von 440 g entzogen worden war. In diesem Teilabschnitt sind die geschätzten Standardabweichungen sehr hoch, da eine starke Ungleichheit in der Verteilung der befruchteten Eier zwischen den einzelnen Käfigen einer Gruppe vorliegt.

Im Teilabschnitt III sind zwischen den Befruchtungsergebnissen der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, zumal auch die Ergebnisse, die mit Sperma erzielt wurden, bei dem das Glycerin vor der Besamung nicht entfernt worden war, mit ca. 10% recht hoch lagen.

Im Teilabschnitt IV konnte mit Sperma, bei dem das Glycerin vor der Besamung mit einer RZB von 680 g entfernt worden war, bei beiden Verdünnern mit ca. 25% ein signifikant höheres Befruchtungsergebnis erzielt werden, als mit Sperma,

dem das Glycerin nicht entfernt worden war. Zwischen den beiden Zentrifugationsstufen von 680 und 1250 g liegt bei beiden Verdünnern kein signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 21: Befruchtungsergebnisse des vierten Versuchsschnittes und die entsprechenden Standardabweichungen (vergleiche Tabellen 14, 16, 18 und 20)

Gruppe	Ver- dünner	(RZB) (g)	Befruch- tungser- gebnis (%)	$\sqrt{V}_{(pv)}$	$\sqrt{V}_{(pb)}$
1	I	280	4,0	4,1	2,0
2	II	280	8,9	3,6	2,8
3	I	820	25,8	3,1	4,6
4	II	820	31,9	3,7	4,9
5	I	---	2,1	1,8	1,5
6	II	---	6,1	3,8	2,4
7	I	440	9,8	5,8	3,1
8	II	440	9,7	2,7	3,0
9	I	920	18,7	7,9	4,1
10	II	920	27,0	6,3	4,7
11	I	---	5,6	2,8	2,2
12	II	---	2,8	2,8	1,6
13	I	550	16,5	6,1	3,7
14	II	550	14,4	4,4	3,7
15	I	1080	17,4	3,5	3,9
16	II	1080	25,9	4,7	4,7
17	I	---	8,7	3,3	2,8
18	II	---	10,4	3,9	3,1
19	I	680	25,5	6,3	4,5
20	II	680	26,2	5,9	4,8
21	I	1250	10,2	4,1	3,3
22	II	1250	11,9	3,7	3,2
23	I	---	7,4	2,8	2,9
24	II	---	6,1	2,5	2,4

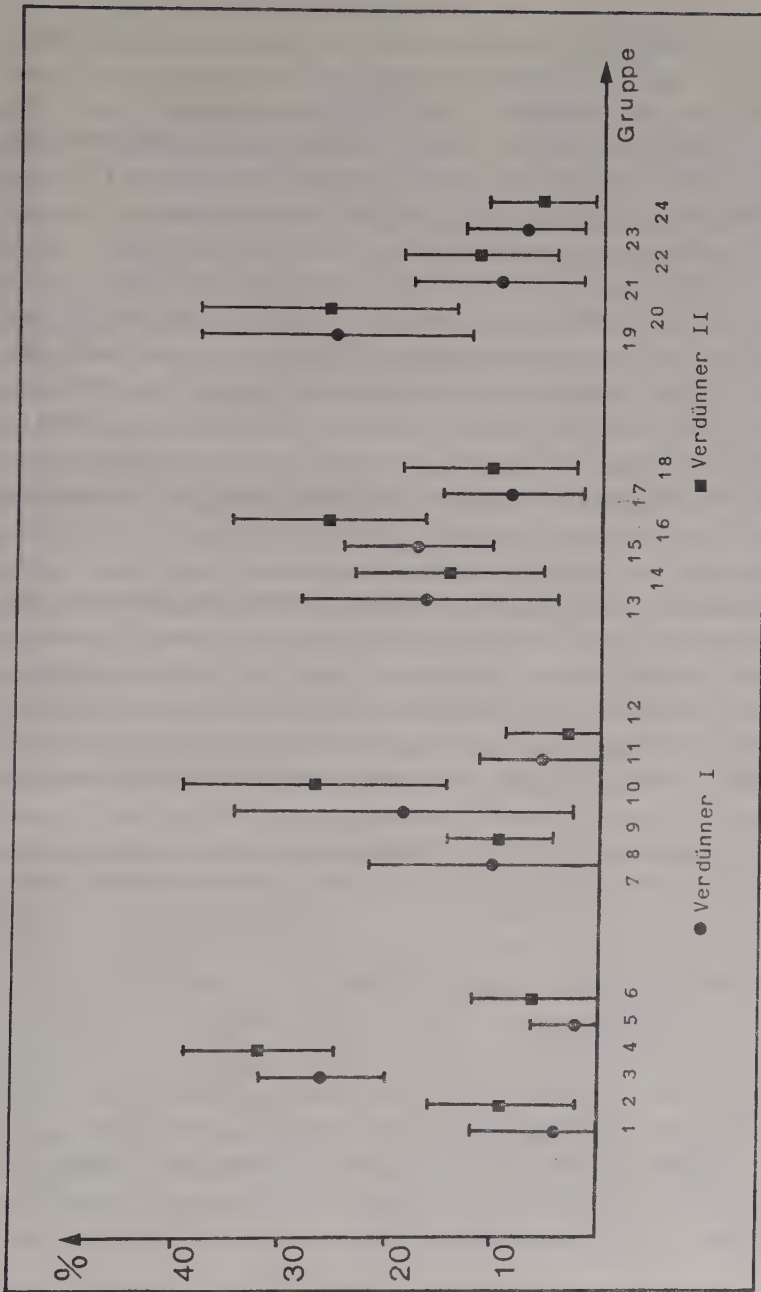


Abb. 19: Befruchtungsergebnisse des vierten Versuchsabschnittes mit den entsprechenden Konfidenzintervallen (doppelte Standardabweichung)

4. DISKUSSION

Bei der Geflügelspermatiefgefrierung hat sich in den letzten Jahren gezeigt, daß mit Glycerin als Kryoprotektivum beste Konservierungsergebnisse erreichbar sind. Es ist jedoch notwendig, das Glycerin vor der Insemination wieder aus der Samenportion zu entfernen, da die Spermien nach LAKE (1968, 1974) bereits bei Temperaturen von über +5°C durch das Glycerin geschädigt werden. Ohne Eliminierung des Glycerins aus der Samenverdünnung sind Besamungserfolge nur mit komplizierten Besamungstechniken, zum Beispiel mit der intrauterinen Besamung möglich. Diese Technik ist mit erheblichen Nachteilen, wie der Störung der Legeleistung sowie der nicht unerheblichen Belastung der Henne durch den Besamungsvorgang selbst, verbunden (BOBR u. Mitarb., 1965; GRIMM, 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurden Besamungsversuche mit Hahnensperma unter Anwendung der intravaginalen Besamungstechnik durchgeführt. Anhand der in der Literatur gemachten Angaben erfolgte die Auswahl der beiden eingesetzten Verdünnernedien und die Einstellung der Glycerinendkonzentration auf 8%. Als Tiefgefrierverfahren wurde die Pelletmethode nach NAGASE und NIWA (1964) gewählt.

Beim Vergleich zwischen flacher und tiefer intravaginaler Besamung zeigte sich, daß nur mit einer Besamungstechnik wie sie LAKE (1974) für den Einsatz von Tiefgefriersperma empfahl, brauchbare Ergebnisse erzielbar sind, während die bei Verwendung von Frischsperma übliche flache Besamungstechnik gänzlich ungeeignet ist. Im Gegensatz zur intrauterinen Inseminationstechnik konnten hier keine negativen Auswirkungen auf die Legeleistung festgestellt werden. Es ist aber notwendig, diese Besamung mit großer Vorsicht auszuführen, da durch die Überwindung der s-förmigen Krümmung der Vagina mit dem Besamungsinstrument leicht eine Verletzung gesetzt werden kann.

Die Empfindlichkeit der Hahnenspermien ist sehr groß. Schon die alleinige Zugabe eines Verdünners brachte einen Abfall der Befruchtungsergebnisse, im Vergleich zu unverdünntem Frischsperma (GRIMM, 1981). Nach LAKE (1968) und SCHRAMM (1976) bewirkt die Zugabe des Glycerins zum unverdünnten Sperma auch erhebliche strukturelle Schäden an den Zellen, die nach dem Auftauen bis zu 90% betragen können. Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, daß durch die Zugabe eines glycerinhaltigen Verdünners zum Frischsperma nur noch Befruchtungsergebnisse bis zu 10% zu erzielen sind. Die so vorgeschädigten Zellen erhalten durch den Tiefgefrierprozeß und durch das Glycerin nach dem Auftauen weitere strukturelle Schädigungen. Da aber der Transport bis zu den Uterovaginaldrüsen aktiv erfolgen muß, ist trotz des Entzuges des Glycerins eine Besamungstechnik notwendig, mit der die vorgeschädigten Spermien so nah wie möglich an diese Spermienpeicher gelangen können. REINHARDT und FISER (1983) wiesen selbst bei Verwendung von Frischsperma nach, daß die tiefe Ablage des Spermas bessere Befruchtungsergebnisse bringt als eine flache Besamung. Auch wurde bei der künstlichen Besamung von Puten von OGASAWARA und FUQUAY (1972) sowie HOLLEMAN und BIELLIER (1976) nachgewiesen, daß die Befruchtungsraten steigen, wenn eine tiefe intravaginale Besamung durchgeführt wurde.

Eine erhebliche Schädigung der Spermien kann mit einer Erhöhung der Besamungsdosis ausgeglichen werden. So wurde mit Besamungsportionen von jeweils ca. 180 Millionen Spermien pro Henne ein Befruchtungsergebnis von 19,4% erzielt, während mit Portionen von ca. 360 Millionen Spermien pro Henne ein Ergebnis von 27,7% erreicht werden konnte. Die in der Literatur beschriebenen Besamungsergebnisse wurden mit relativ hohen Besamungsdosen erreicht. So verwendeten LAKE und STEWART (1978a) sowie LAKE und Mitarbeiter (1981) für ihre Besamungsversuche eine Dosis von ca. jeweils 500 Millionen Spermien pro Henne. DUPLAIX und SEXTON (1984) erhiel-

ten die besten Befruchtungsergebnisse mit einer Dosis von 300 Millionen Spermien pro Henne, während YOUSIF und Mitarbeiter (1984) eine Dosis von 225 Millionen verwendeten. Bei vielen anderen Autoren fehlen aber genaue Angaben über die Spermienzahl in der Besamungsportion. ROHLOFF und Mitarbeiter (1983) stellten bei Verwendung einer Dosis von 80 Millionen vorwärtsbeweglichen Spermien ein Besamungsergebnis bei intrauteriner Besamung von 43% fest, während dieses Ergebnis bei Verwendung von ca. 160 Millionen vorwärtsbeweglichen Spermien pro Dosis bei über 50% lag.

Der Verdünnungsgrad des Tiefgefrierspermas soll nach VAN WAMBEKE (1980) und SEXTON (1980) bei 1:2 bis 1:4 liegen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß mit einem Besamungsergebnis von 26,3% bei einer Verdünnung von 1:2 das beste Ergebnis zu erreichen war. Aber auch mit den Verdünnungsgraden von 1:4 bis 1:6 lagen die Ergebnisse mit 22,3% bzw. 21,3% nicht wesentlich niedriger. Bei der Anwendung des Pelletverfahrens empfiehlt es sich aus technischen Gründen den Verdünnungsgrad so gering wie möglich zu halten, da der Arbeitsaufwand mit steigender Verdünnungsrate ebenfalls steigt, und zwar sowohl bei der Herstellung der Pellets als auch bei der Entfernung des Glycerins vor der Besamung. Nach SEXTON (1981b) muß mit steigenden Verdünnungen des Ejakulates auch die Spermiendosis erhöht werden, um gleichgute Ergebnisse zu erzielen.

Obwohl die Entfernung des Glycerins durch Zentrifugation gut gelingt, muß bei diesem Verfahren auch mit einer Schädigung der Spermien gerechnet werden. Im Versuchsabschnitt III der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Zentrifugation auf die Spermien durch Beurteilung ihrer Motilität untersucht. Mit zunehmender Zentrifugalbeschleunigung wurden nach der Zentrifugation niedrigere Werte für die Spermienmotilität gemessen. Auch nimmt die Motilität der Spermien bis zu einer Stunde nach der Zentrifugation bei steigender Zentrifugalbeschleunigung schneller ab. Es ist also erforder-

lich, in einem Bereich zu arbeiten, wo zwar gesichert ist, daß der größere Teil des Glycerins entfernt wird, wo aber die Schäden an den Spermien durch die Zentrifugation noch in einem vertretbaren Rahmen bleiben. In den eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß zwischen den beiden verwendeten Verdünnern kein wesentlicher Unterschied besteht. Die durchgeführten Besamungsversuche ließen erkennen, daß beim Saccharid-Glutaminat-Verdünner nach SCHRAMM und LÖHLE (1976) (Verdünner I) mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 680 g bis 820 g und bei dem von LAKE (1968) beschriebenen Glutaminat-Verdünner (Verdünner II) mit einer RZB von 680 g bis 1080 g Befruchtungsergebnisse von mehr als 20% erzielt werden konnten. Die Befruchtungsergebnisse, die mit Spermia erzielt wurden, bei dem das Glycerin mit einer RZB zwischen 680 g und 1080 g entfernt worden war, waren teilweise signifikant höher als die Befruchtungsergebnisse, die nach Glycerinentfernung mit einer RZB von 280 g, 440 g oder 1250 g erzielt werden konnten. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug bei der Zentrifugation im Bereich von 680 g bis 1080 g direkt nach der Zentrifugation noch ca. 50%, so daß anzunehmen ist, daß noch eine genügend große Anzahl befruchtungsfähiger Spermien vorhanden ist.

Die Befruchtungspersistenz der Spermien bei Verwendung von Frischsperma hält etwa 14 Tage an (PINGEL u. JEROCH, 1980), während bei Verwendung von konserviertem Sperma diese Zeitspanne nicht erreicht wird (SEXTON, 1977). In den vorliegenden Untersuchungen wurde festgestellt, daß bei Verwendung von unverdünntem Frischsperma die Befruchtungspersistenz bis zum 8. Tag nach der letzten Besamung keinen wesentlichen Abfall erkennen läßt. Allein bei der Verwendung von Frischsperma, das mit dem Verdünner I oder Verdünner II im Verhältnis 1:2 verdünnt worden war, fiel die Befruchtungspersistenz bereits vom 5. Tag nach der letzten Besamung beginnend deutlich ab. Bei Verwendung von Tiefgefriersperma konnten in der Zeit vom 5. bis zum 8. Tag nach der letzten

Besamung nur noch sporadisch befruchtete Eier gewonnen werden. In der Zeit vom 2. Tag nach der ersten Besamung bis zum 4. Tag nach der letzten Besamung waren die Befruchtungsergebnisse teilweise aber recht gut. Wie aus der Tabelle 22 zu erkennen ist, lagen sie im Bereich zwischen 30 und 40%, wobei bei Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 820 g und Verwendung des Verdünners II sogar 42,4% der gelegten Eier befruchtet worden waren.

Tabelle 22: Befruchtungsergebnisse mit Tiefgefriersperma für die Zeit vom 2.-9. Tag nach der ersten Besamung (4. Tag nach der letzten Besamung) für den RZB-Bereich von 680 bis 1080 g, nach Verdünner I und Verdünner II getrennt.

Entfernung des Glycerins mit einer RZB von	Verdünner I $\frac{E}{B}$ (%)	Verdünner II $\frac{E}{B}$ (%)
680 g	$\frac{63}{22}$ (34,9)	$\frac{50}{19}$ (38,0)
730 g	$\frac{68}{26}$ (38,2)	-----
730 g	$\frac{72}{26}$ (36,1)	-----
820 g	$\frac{58}{21}$ (36,2)	$\frac{59}{25}$ (42,4)
920 g	$\frac{63}{17}$ (27,0)	$\frac{64}{22}$ (34,4)
1080 g	$\frac{56}{14}$ (25,0)	$\frac{57}{19}$ (33,3)
$\frac{E}{B}$ = $\frac{\text{Anzahl der Eier im angegebenen Versuchsabschnitt}}{\text{Zahl der befruchteten Eier, d.h. der lebenden Embryonen am 14. Tag der Inkubation}}$		

WATANABE und TERADA (1980a) zeigten, daß bei Verwendung von Tiefgefriersperma das Befruchtungsergebnis nach intrauteriner Besamung in der ersten Woche 47%, in der zweiten Woche jedoch nur noch 14% betrug. SEXTON und Mitarbeiter (1978) gaben für die durchschnittliche Dauer der Befruchtungspersistenz 2-4 Tage an. Diese Angaben betragen bei ANSAH und Mitarbeitern (1982a) 3-4,5 Tage. LAKE und STEWART (1978a) sowie LAKE und Mitarbeiter (1981) erhielten in der Zeit vom 2.-6. Tag nach der Besamung ein Befruchtungsergebnis von mehr als 90%. Wenn sie die Zeit vom 2.-8. Tag nach der Besamung zugrunde legten, betrug das Ergebnis nur noch 84%.

Eine erhebliche Verbesserung der Befruchtungsergebnisse ist durch eine Selektion der Hennen auf Fruchtbarkeit auch bei Verwendung von Tiefgefriersperma möglich. Nach LAKE (1970, 1975) soll es im Hinblick auf ihre Fruchtbarkeit zwischen den Hennen größere Unterschiede geben, und zwar vor allem was die Dauer der Befruchtungspersistenz betrifft. SEXTON (1976b) bestreitet dies allerdings mit dem Hinweis, daß er von 95% aller Hennen befruchtete Eier erhalten konnte, wobei er aber auf die Befruchtungspersistenz nicht einging. Von anderen Autoren liegen diesbezüglich keine Angaben vor. In den vorliegenden Untersuchungen konnten bei Verwendung von unselektierten Hennen die von LAKE gemachten Angaben bestätigt werden. Die Befruchtungspersistenz war zwischen den einzelnen Hennen sehr unterschiedlich. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, daß in einer Gruppe nicht alle Hennen befruchtete Eier legten. Gerade in den Gruppen, wo nur wenige Eier befruchtet wurden, konnte festgestellt werden, daß diese Eier jeweils nur aus einem oder zwei Käfigen kamen, so daß in diesen Gruppen jeweils nur 1-4 Hennen befruchtete Eier legten. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß bei entsprechender Hennenselektion wohl eine Erhöhung der Befruchtungsergebnisse möglich ist.

Eine weitere wichtige Verbesserung der Befruchtungsergeb-

nisse ist durch die Selektion der Hähne auf Einfrierbarkeit ihrer Ejakulate erreichbar. LAKE (1970) wies auf große Unterschiede in Bezug auf die Einfrierbarkeit der Ejakulate zwischen einzelnen Hähnen hin. Der beste von ihm getestete Hahn hatte eine Befruchtungsrate von 71%. Von 35 getesteten Hähnen zeigten nur 20 Hähne gute Befruchtungsergebnisse. LAKE und STEWART (1978a) sowie LAKE und Mitarbeiter (1981) verwendeten für ihre Versuche daher nur selektierte Hähne und erreichten damit sehr gute Befruchtungsergebnisse. LADA-GORZOWSKA und Mitarbeiter (1975) beobachteten ebenfalls große individuelle Unterschiede zwischen den Hähnen. Nach einmaliger Insemination erzielten sie Befruchtungsergebnisse, die zwischen den Hähnen von 0-40% schwankten. LADA-GORZOWSKA und Mitarbeiter (1979) testeten acht Hähne, wobei der beste Hahn ein Befruchtungsergebnis von 85,7% aufwies. Von zwölf getesteten Hähnen hatten nur sieben Hähne ein Befruchtungsergebnis von mehr als 50% (LADA-GORZOWSKA u. Mitarb., 1984). Bei den von MITCHELL und Mitarbeitern (1976b) getesteten Hähnen konnten ein Drittel der Hähne keine Eier befruchten. BUCKLAND verglich 1971 Frischsperma und konserviertes Sperma von mehreren Hähnen miteinander. Er stellte dabei fest, daß der Einfluß von einzelnen Blutlinien bei konserviertem Sperma größer ist als bei Frischsperma. Die größte Möglichkeit der Selektion ist aber auch hier die Länge der Befruchtungspersistenz. WOLFF und Mitarbeiter (1976) sowie MITCHELL und Mitarbeiter (1977) stellten in ihren Arbeiten heraus, daß die Fähigkeit der Spermien, die Gefrierphase zu überstehen, heritabel sein soll.

SEXTON und Mitarbeiter (1978) verglichen die Befruchtungsergebnisse von selektierten und unselektierten Hähnen. Das Ergebnis betrug 36% beim selektierten Material und nur 18,2% bei der Kontrollgruppe. Bei ähnlichen Versuchen betrugen die Ergebnisse bei ANSAH und Mitarbeitern (1982b) 27% zu 15,4% und bei YOUSIF und Mitarbeitern (1984) 45% zu 28%. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, die die eigenen

V Versuchsergebnisse übertreffen, sind nur durch Selektion der Hähne ermöglicht worden. Bei Verwendung von unselektierten Hähnen liegen die bisher vorliegenden Ergebnisse alle im Bereich bis zu 30% Befruchtungen. Über eine Vorselektion der Hennen machen die meisten Autoren allerdings keine Angaben. Die in dieser Arbeit erreichten Befruchtungsergebnisse wurden alle mit unselektierten Hähnen und Hennen erzielt.

Abschließend kann bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse festgestellt werden, daß in mit Glycerin als Kryoprotektivum konserviertem Hahnensperma nach dem Auftauen gute Vorwärtsbewegung zu erkennen ist. Nach Entfernung des Glycerins vor der Besamung mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von ca. 700 bis 1000 g über eine Zeit von 15 Minuten konnten mit Tiefgefriersperma bei intravaginaler Besamung ohne Beeinflussung der Legeleistung Befruchtungsergebnisse von 30-40% erreicht werden. Da die Verwendung von Tiefgefriersperma in der Geflügelzucht auch in Zukunft nur für die Erhaltung besonderer Zuchtlinien und die Anlage von Genreservoirs Anwendung finden wird, können die Ergebnisse als zufriedenstellend angesehen werden. In der Geflügelvermehrung wird derzeit wegen der niedrigeren Kosten auch in Zukunft die Verwendung von Frischsperma vorzuziehen sein. Für hohe Befruchtungsergebnisse nach Verwendung von Tiefgefriersperma sind in Zukunft die Anlage von Samenbanken notwendig, wo nur beste Ejakulate, von vorselektierten Hähnen stammend, gelagert werden. Da die Befruchtungspersistenz von Tiefgefriersperma nur sehr kurz ist, ist im Interesse einer Effektivitätssteigerung eine zweimalige Besamung pro Woche zu empfehlen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Klärung des Einsatzes von Gefrierschutzsubstanzen bei der Tiefgefrierung von Hahnensperma wurden Besamungsversuche mit Hilfe des Kryoprotektivums Glycerins in einer Endkonzentration von 8% vorgenommen. Als Verdünner wurden der Saccharid-Glutaminat-Verdünner nach SCHRAMM und LÖHLE (1976) (Verdünner I) und der von LAKE (1968) beschriebene Glutaminat-Verdünner (Verdünner II) gewählt. Die Spermaproben wurden innerhalb von 60 Minuten auf +5°C abgekühlt und nach dem Pelletverfahren (NAGASE u. NIWA, 1964) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Glycerin wurde nach dem Auftauen der Samenproben durch Zentrifugation entfernt. Bei den Zentrifugationsversuchen zeigte sich, daß bei Zunahme der Zentrifugationsbeschleunigung der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien, direkt nach der Zentrifugation gemessen, linear abfällt. In der Zeit bis zu einer Stunde nach der Zentrifugation fiel die Motilität der Spermien ebenfalls stark ab, wenn die Samenproben bei +25°C gelagert wurden.

Die flache intravaginale Besamung erwies sich bei der Verwendung von Tiefgefriersperma als gänzlich ungeeignet. Nur mit der von LAKE (1974) beschriebenen tiefen intravaginalen Besamung konnten gute Befruchtungsergebnisse erzielt werden. Eine Verdoppelung der Besamungsdosis auf ca. 360×10^6 Spermien brachte eine Anhebung der Befruchtungsergebnisse auf 27,7% gegenüber 19,4%, die mit der einfachen Besamungsdosis von ca. 180×10^6 Spermien erzielt werden konnten. Bei der Samenverdünnung war ein Verdünnungsverhältnis von 1:2 günstiger als ein Verdünnungsverhältnis von 1:4 bzw. 1:6. Bei einem Verdünnungsgrad von 1:2 war mit 26,4% ein besseres Befruchtungsergebnis zu erzielen als bei den anderen Verdünnungsgraden, bei denen maximal 22% der Eier befruchtet wurden.

Es wurden vergleichende Untersuchungen mit zwei verschie-

denen Verdünnern angestellt, wobei das Kryoprotektivum Glycerin mit einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 280 g, 440 g, 550 g, 680 g, 820 g, 920 g, 1080 g und 1250 g aus den Samenverdünnungen entfernt wurde. Befruchtungsergebnisse von 20-30% für die Zeit vom 2. Tag nach der ersten Besamung bis zum 8. Tag nach der letzten Besamung konnten beim Verdünner I nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 680 g und 820 g erreicht werden. Für den Verdünner II konnten solche Ergebnisse nach Entfernung des Glycerins bei einer RZB von 680 g, 820 g, 920 g und 1080 g erzielt werden. Bei Zugrundelegung des Zeitraumes vom 2. Tag nach der ersten Besamung bis zum 4. Tag nach der letzten Besamung waren Befruchtungsergebnisse von 30-40% bei Anwendung einer RZB von 680-1080 g ohne Selektion von Hähnen und Hennen auf Fruchtbarkeit möglich. Das beste Befruchtungsergebnis mit 42,4% wurde bei Verwendung des Verdünners II und nach Entfernung des Glycerins mit einer RZB von 820 g bei tiefer intravaginaler Besamung erzielt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALLEN, T.E. (1958)
The storage of fowl semen at low temperatures.
Proc.Austr.Soc.Anim.Prod. 2, 118-119
- ALLEN, T.E. und BOBR, L.W. (1955)
The fertility of fowl spermatozoa in glycerol diluents after
intrauterine insemination.
Poultry Sci. 34, 1167-1169
- ALLEN, T.E. und GRIGG, G.W. (1957)
Sperm transport in the fowl.
Australian J.Agric.Res. 8, 788-799
- AMANTEA, G. (1922)
Ricerche sulla secrezione spermatica. XIV La raccolta dello
sperma nel gallo.
Rendicanti della R.Acad.Naz.dei lincei 31, 7-8
- ANSAH, G.A. und BUCKLAND, R.B. (1982a)
The uptake of glycerol, -aminoisobutyric acid and 2-desoxy-D-
glucose by spermatozoa of a line of chickens selected for
fertility of frozen-thawed semen and a control line.
Theriogenology 17 (4), 401-408
- ANSAH, G.A. und BUCKLAND, R.B. (1982b)
Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid
levels and the relationships of these lipids with fertility of
frozen-thawed and fresh semen.
Poultry Sci. 61, 623-637
- ASHIZAWA, K.; NISHIYAMA H. und NAGAE, T (1976)
Effects of oviducal cells on the survival and fertilizing
ability of fowl spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 47, 305-311
- ASHIZAWA, K. und NISHIYAMA, H. (1977)
Effects of various cultured cells on the survival and fertili-
zing ability of fowl spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 49, 405-407
- ASHIZAWA, K. und NISHIYAMA, H. (1983a)
Effects of oviducal cells on the maintenance of motility and
fertilizing capacity of fowl spermatozoa stored in a diffusion
chamber.
Poultry Sci. 62, 2276-2279
- ASHIZAWA, K. und NISHIYAMA, H. (1983b)
Prolonged survival of fowl spermatozoa stored in a diffusion
chamber in vitro.
Brit.Poultry Sci. 24, 101-109

- ASHIZAWA, K. und OKAUCHI, K. (1984)
Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma.
J.Reprod.Fert. 71, 593-598
- BAKST, M.R. und SEXTON, T.J. (1979)
Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing.
J.Reprod.Fert. 55, 1-7
- BECHSTEDT, U.; LÜHLE, K. und SCHRAMM, R. (1975)
Untersuchungen zur Verdünnung und Kurzzeitkonservierung von Hahnensperma.
Monatsh.f.Vet.-med. 30, 937-940
- BERGMANN, V. und SCHRAMM, G.-P. (1979)
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung der Tiefgefrierkonservierung auf Hahnensperma.
Archiv für Tierzucht 22, 47-54
- BOBR, L.W.; LORENZ, F.W. und OGASAWARA, F.X. (1962)
The role of uterovaginal junction in storage of cock spermatozoa.
Poultry Sci. 41, 1628
- BOBR, L.W.; LORENZ, F.W. und OGASAWARA, F.X. (1964)
Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds.
J.Reprod.Fert. 8, 39-47
- BOBR, L.W.; LAKE, P.E.; LORENZ, F.W.; OGASAWARA, F.X. und KRZANOWSKA, H. (1965)
Inhibition of ovulation in the domestic hen by intrauterine insemination.
Poultry Sci. 44, 659-661
- BOGDONOFF, P.D. und SHAFFNER, C.S. (1954)
The effect of pH on in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen.
Poultry Sci. 33, 665-669
- BORNSTEIN, S.; SCHINDLER, H.; GABRIEL, J. und MOSES, E. (1960)
Fertilization rate of chickens inseminated in the morning or in the afternoon.
Israel J.Agric.Res. 10, 183-191
- BROWN, J.E.; HARRIS JR., G.C. und HOBBS, T.D. (1963)
Effect of intraperitoneal insemination on egg production and fertilizing capacity of fresh and frozen chicken sperm.
Poultry Sci. 42, 810-815

- BROWN, K.J. und GRAHAM, E.F. (1971)
Effect of some cryophylactic agents on turkey spermatozoa.
Poultry Sci. 50, 832-835
- BUCKLAND, R.B. (1971)
The activity of six enzymes of chicken seminal plasma and sperm.
1. Effect of in vitro storage and full sib families on enzyme activity and fertility.
Poultry Sci. 50, 1724-1734
- BURKE, W.H.; OGASAWARA, F.X. und FUQUAY, C.L. (1972)
A study of the ultrastructure of the uterovaginal spermstorage glands of the hen, *Gallus domesticus*, in relation to a mechanism for the release of spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 29, 29-36
- BURROWS, W.H. und QUINN, J.P. (1935)
A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl.
Poultry Sci. 14, 251-254
- BURROWS, W.H. und QUINN, J.P. (1937)
The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey.
Poultry Sci. 16, 19-24
- BUSCH, W.; LÖHLE, K. und PETER, W. (1982)
Künstliche Besamung bei Nutztieren.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 494-519
- CLARK, C.E. und SHAFFNER, C.S. (1960)
Fertilizing capacity of frozen chicken sperm and the influence of related in vitro processes.
Poultry Sci. 39, 1213-1220
- CLARK, C.E. und SARAHOON, K. (1967)
Influence of ambient temperature on reproductive traits of male and female chickens.
Poultry Sci. 46, 1093-1098
- COCHRAN, W. (1972)
Stichprobenverfahren.
De Gruyter-Verlag, Berlin-New York, 83-91
- COMPTON, M.; VAN KREY, H. und SIEGEL, P. (1978)
The filling and emptying of the uterovaginal spermhost glands in the domestic hen.
Poultry Sci. 57, 1696-1700
- COOPER, D.M. (1955)
A note on a collection apparatus for avian semen.
Vet.Rec. 67, 331-332

- COOPER, D.M. (1965)
Artificial insemination in poultry.
Wld's.Poultry Sci. 21, 12-22
- DE SILVA, P.L.G. (1962)
Artificial insemination in poultry.
1. Collection of semen from the cock.
Ceylon Vet.J. 10 (4), 124-127
- DE SILVA, P.L.G. (1963)
Artificial insemination in the fowl.
2. Technique of insemination.
Ceylon Vet.J. 11 (1), 13-15
- DIXON, W.J. (1981)
BMDP statistic software.
Univ.of Calif.press, London
- DUPLAIX, M. und SEXTON T.J. (1983)
Effects of prefreeze treatments on the fertilizing capacity of unfrozen and frozen chicken semen: Extender characteristics and dilution method.
Poultry Sci. 62, 2255-2260
- DUPLAIX, M. und SEXTON, T.J. (1984)
Effects of type of freeze straw and thaw temperature on the fertilizing capacity of frozen chicken semen.
Poultry Sci. 63, 775-780
- EL JACK, M.H. und LAKE, P.E. (1966)
The effect of resting roosters from ejaculation on the quality of spermatozoa in semen.
J.Reprod.Fert. 11, 489-491
- ETCHES, R.J.; WILLIAMSON, R.G.; REINHART, B.S. und MAC PHERSON, J.W. (1980)
A comparison of several extenders and methods for freezing avian semen.
Proc.9.Int.Congr.Anim.Reprod. A. I. Madrid III, 413
- FEWLESS, T.A.; SEXTON, T.J. und SHAFFNER, C.S. (1975)
Effects of various levels of egg, yolk, milk, seminal plasma or blood serum on the respiration and reproductive efficiency of chicken spermatozoa.
Poultry Sci. 54, 346-349
- FISCHER, R.A. und YATES, F. (1963)
Statistical tables for biological, agricultural and medical research.
Verlag Oliver and Boyd, London

- FRÖBÖSE, H. (1928)
Die mikroskopische Anatomie des Legedarms und Bemerkungen über die Bildung der Kalkschale beim Huhn.
Z.mikr.-anat.Forsch. 14, 447-482
- FUJII, S. und TAMURA, T. (1963)
Location of sperms in the oviduct of the domestic fowl with special reference to storage of sperms in the vaginal gland.
J.Fac.Fish.Animal Husb.Hiroshima Univ. 5 (1), 145-163
- GIESEN, A.F. und McDANIEL, G.R. (1980)
Effect of time of day of artificial insemination and oviposition - insemination interval on the fertility of broiler breeder hens.
Poultry Sci. 59, 2544-2549
- GLEICHAUF, R. (1973)
Altersbedingte Veränderungen von Volumen und Spermakonzentration von Leghorn-Hähnen unterschiedlicher Linienzugehörigkeit.
Celler Jahrbuch 22, 20
- GRACEWSKI, J.J. und SCOTT, H.M. (1943)
The influence of time of mating on fertility.
Poultry Sci. 22, 264-265
- GRAU, H. (1943)
Anatomie der Hausvögel.
In: ELLENBERGER-BAUM, Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere.
Springer-Verlag, Berlin
- GRIGG, G.W. (1957)
The structure of stored sperm in the hen and the nature of the release mechanism.
Poultry Sci. 36, 450-451
- GRIGG, G.W. und HODGE, A.J. (1949)
Electron microscopic studies of spermatozoa.
I. The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (gallus domesticus).
Australian J.Scientific Res. B 2, 271-286
- GRIMM, R. (1981)
Erfahrungen mit der künstlichen Besamung beim Haushuhn unter Verwendung von Tiefgefriersperma.
Vet.-med. Diss. FU Berlin
- GRODZINSKY, R. und MARCHLEWSKI, J. (1935)
Studies on the motility of spermatozoa of the domestic fowl outside the organism.
Bull.Acad.Polon.Sci.u.Lettres Serie B, Sc.Nat. 11, 347-361

- GROVE, D. (1961)
Die Samenübertragung bei Hühnern unter besonderer Berücksichtigung der Samenkonservierung.
Vet.-med. Diss. Ti.-Ho. Hannover
- GROVE, D. (1963)
Zur Samenübertragung beim Geflügel.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 158-161
- GROVE, D. und TIEFENBACH, B. (1961)
Möglichkeiten der Untersuchung des Haushahnes beim Vorliegen des Verdachtes auf Befruchtungsunfähigkeit.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 74, 101-106
- HAMMERSTEDT, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W.; AMANN, R.P.; ASUDA, D. und ARIEL C.C. (1978)
Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity on sperm.
Biol.Reprod. 18, 686-696
- HARRIS Jr., G.C. (1965)
Preservation of chicken semen in liquid nitrogen at -196°C.
Poultry Sci. 44, 1376
- HARRIS Jr., G.C. (1968)
Fertility of chickens inseminated intraperitoneally with semen preserved in liquid nitrogen.
Poultry Sci. 47, 384-388
- HARRIS Jr., G.C.; THURSTON, R.J. und CUNDALL, J. (1973)
Changes in the ultrastructure of fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw.
J.Reprod.Fert. 34, 389-394
- HOBBS, T.D. und HARRIS Jr., G.C. (1963)
Effect of freezing point depression and pH on motility and fertility of chicken spermatozoa in sodium citrate extenders.
Poultry Sci. 42, 254-259
- HOFKINS, C. (1950)
Examination of the semen of cockerels.
Vlaams diergeneesk. Tijdschr. 19, 130-136
- HOLLEMAN, K.A. und BIELLIER, H.V. (1976)
Fertility and embryonic livability as influenced by depth of insemination of turkey hens.
Poultry Sci. 55, 1154-1156
- HOWARTH Jr., B. (1983)
Comparison of diluents for holding cock semen six hours at 41°C.
Poultry Sci. 62, 1084-1087

- HOWARTH Jr., B. und DIGBY, S.T. (1973)
Evidence for the penetration of the vitelline membrane of the hen's ovum by a trypsin-like acrosomal enzyme.
J.Reprod.Fert. 33, 123-125
- ISHIKAWA, H. (1930)
The life of cock spermatozoa outside the body.
Proc.4.World's Poultry Congr., 90-94
- IVANOV, E. (1913)
Expériences sur la fécondation artificielle des oiseaux.
Compt.rend Soc.biol.Paris 75, 371-374
zit. nach GROVE (1961)
- IYPE, P.T.; ABRAHAM K.A. und BHARGAVA, P.M. (1963)
Further evidence for a positive role of acrosome in the uptake of labelled amino acids by bovine and avian spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 5, 151-158
- JOHNSTON, N.P. und PARKER, J.E. (1970)
The effect of time of oviposition in the relation to insemination on fertility of chicken hens.
Poultry Sci. 49, 532-533
- KAMAR, G.A.R. und HAFEZ, E.S.E. (1975)
Sperm maturation and fertility in poultry.
ABA 43, 99-108
- KASHIWABARA, T. (1964)
Size of sperm head and of red blood cells in the domestic fowl.
Poultry Sci. 43, 411-414
- KING, A.S. und McLELLAND, J. (1978)
Anatomie der Vögel.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, UTB 790
- KOSIN, I.L. (1944)
Some aspects of the biological action of x-rays on cock spermatozoa.
Physiol.Zool. 17, 289-319
- KOSIN, I.L. (1962)
The reproduction in poultry.
In: HAFEZ, Reproduction in Farm Animals.
Lea & Febiger, Philadelphia, 277-293
- KURBATOV, A.D.; NARUBINA, L.E. und IVANOV, B.I. (1970)
Vlijanie DMSO i ethilenglycolija na peredschivajemost i oplodotvorija jutschuju spocobnost spermatoziodov petukhov.
In: Voprossi ickusstvennovo ocemenenuja kur, Band XVI, 89
zit. nach SCHRAMM, R. (1980)

- KURBATOV, A.D.; NARUBINA, L.E. und IVANOV, B.I. (1973)
Ispytanie nekotorykh krioprotektorov prizamorazhivanii spermy petukhov.
(A test of some cryoprotectants in the freezing cock semen)
Zhivotnykh 19, 198-202
- KURBATOV, A.D.; NARUBINA, L.E.; BUBLYAYEVA, G.B. und IVANOV, B.I. (1976)
Freezing cock sperm in liquid nitrogen.
Proc.8.Int.Congr.Anim.Reprod. A.I. Krakau, 1006-1008
- LADA-GORZOWSKA, A. und KRAWCZYK, E. (1975)
Mrozenie nasienia kogutow (Gallus domesticus).
(Freezing of fowl semen.)
Rocz.Nauk.Zoot. 2, 21-29
- LADA-GORZOWSKA, A. und PODGORNÝ, E. (1976)
Freezing cock semen in liquid N₂ of heavy and light type breeds.
Proc.8.Int.Congr.Anim.Reprod. A.I. Krakau, 1027-1029
- LADA-GORZOWSKA, A.; KRAWCZYK, E.; FIMA, D. und WATANABE, M. (1978)
Freezing of fowl semen (gallus domesticus).
J.Fac.Fish.Anim.Husb.Hiroshima Univ. 17, 143-148
- LADA-GORZOWSKA, A.; KRAWCZYK, E. und PODGORNÝ, E. (1979)
Badania nad zamrazaniem nasienia kogutow w ciekłym azocie.
(A study on freezing cock semen in liquid nitrogen.)
Rocz.Nauk.Zoot. 6, 29-41
- LADA-GORZOWSKA, A.; DROBA, M.; DROBA, B. und DZIKOWSKA, J. (1984)
Zależność między aktywnością arylosulfatazy w niesieniu koguta a wynikami zapłodnienia po inseminacji kur.
(Beziehung zwischen der Aktivität der Arylsulphatase im Hahnensamen und den Ergebnissen der Befruchtung nach der künstlichen Besamung der Hennen.)
Rocz.Nauk.Zoot. 11, 15-22
- LAIBLIN, C. (1974)
Ein Beitrag zur Tiefgefrierung von Kaninchensperma.
Vet.-med. Diss. FU Berlin
- LAKE, P.E. (1956)
A retarding factor in the problem of fowl semen storage.
Proc.3.Int.Congr.Anim.Reprod. A.I. Cambridge 3, 104-106
- LAKE, P.E. (1957a)
The male reproductive tract of the fowl.
J.Anat. 91, 116-129
- LAKE, P.E. (1957b)
Fowl semen as collected by the massage method.
J.Agric.Sci. 49, 120-126

- LAKE, P.E. (1960)
Studies of dilution and storage of fowl semen.
J.Reprod.Fert. 1, 30-35
- LAKE, P.E. (1967)
Artificial insemination in poultry and the storage of semen - a re-appraisal.
Wld's.Poultry Sci. 23, 111-132
- LAKE, P.E. (1968)
Observations on freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen.
Proc.6.Int.Congr.Anim.Reprod. A.I. Paris 2, 1633-1635
- LAKE, P.E. (1970)
The storage of fowl spermatozoa in liquid nitrogen.
Proc.14.Wld's.Poultry Cong. Madrid, 279-282
- LAKE, P.E. (1971)
The male in reproduction.
In: BELL & FREEMANN, Physiology and biochemistry of the domestic fowl, Vol.3, 1411-1447
Academic Press, London
- LAKE, P.E. (1974)
Die künstliche Besamung beim Geflügel.
In: PAUFLEDER, Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch, 223-251
Verlag M. u. H. Schaper, Hannover
- LAKE, P.E. (1975)
Gamete production and the fertile period with particular reference to domesticated birds.
Symposium of the Zool.Soc. of London 35, 225-244
- LAKE, P.E. (1978)
The use of diluents and semen storage in AI.
Poultry Int. 17 (11), 34-45
- LAKE, P.E. (1984)
Problemy związane z przechowywaniem in vitro nasienia koguta i indorow.
(Problems of in vitro storage of chicken and turkey semen.)
Biuletyn Informacyjny JZ, Krakow 22 (6), 17-21
- LAKE, P.E. and WOOD-GUSH, D.G.M. (1956)
Diurnal rhythm in semen yields and mating behaviour in the domestic cock.
Natur 178, 853
- LAKE, P.E. and McINDOE, W.M. (1959)
The glutamic acid and creatine content of cock seminal plasma.
Biochem.J. 71, 303-306

- LAKE, P.E.; SCHINDLER, H. und WILCOX, F.H. (1959)
Long distance transportation of fowl semen by air.
Vet.Record 71, 52-54
- LAKE, P.E. und McINDOE, W.M. (1976)
Storage of poultry semen at different temperatures.
Proc.8.Int.Congr.Anim.Reprod. A.I. Krakau, 1020-1023
- LAKE, P.E. und STEWART, J.M. (1978a)
Preservation of fowl semen in liquid nitrogen - An improved method.
Brit.Poultry Sci. 19, 187-194
- LAKE, P.E. und STEWART, J.M. (1978b)
Artificial insemination in poultry.
Bull.No 213, Ministry of Agric., Fish and Food, London
- LAKE, P.E. und RAVIE, O. (1979)
Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5°C in fluids of different pH.
J.Reprod.Fert. 57, 149-155
- LAKE, P.E.; BUCKLAND, R.B. und RAVIE, O. (1980)
Effect of glycerol on the viability of fowl spermatozoa - implications for its use in freezing semen.
Cryoletters 1, 299-304
- LAKE, P.E.; RAVIE, O. und McADAM, J. (1981)
Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: Application to breeding programmes.
Brit.Poultry Sci. 22, 71-77
- LAKE, P.E. und RAVIE, O. (1982)
Dimethyl Acetamid as a cryoprotectant for fowl spermatozoa.
Poultry Sci. 61, 1497-1498
- LAKE, P.E. und RAVIE, O. (1984)
An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa.
Brit.Poultry Sci. 25, 145-150
- LEHRER, A.R. und SCHINDLER, H. (1969)
The influence of hen oviduct homogenates on the motility, oxygen uptake and fertilizing capacity of fowl spermatozoa.
Poultry Sci. 48, 30-36
- LOEFFLER, K. (1978)
Anatomie und Physiologie des Geflügels.
In: SCHOLTYSEK & DOLL, Nutz- und Ziergeflügel, 15-85
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

- LORENZ, F.W. (1969)
Reproduction in domestic fowl.
In: COLE & CUPPS, Reproduction in domestic animals, 569-608
Academic Press, New York
- LORENZ, F.W. und OGASAWARA, F.X. (1968)
Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in
domestic birds.
VI. The relations of fertility and embryo normality with site
of experimental insemination.
J.Reprod.Fert. 16, 445-455
- LORENZ, R. (1984)
Grundbegriffe der Biometrie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- MAC PHERSON, J.W.; CHATTERJEE, S. und FRIARS, G.W. (1969)
Frozen turkey semen.
Can.J.comp.Med. 33, 37-38
- MAEDA, T.; TERADA, T. und WATANABE, M. (1980)
Scanning electron microscopic studies of frozen fowl semen.
J.Fac.Appl.Biol.Sci.Hiroshima Univ. 19, 11-20
- MAEDA, T. und TERADA, T. (1982)
The morphology of fowl spermatozoa stored at 5°C in diluents of
various osmotic pressures.
Jap.Poultry Sci. 19 (6), 344-350
- MAEDA, T.; TERADA, T. und TSUTSUMI, Y. (1984)
Comparative study of the effects of various cryoprotectants in
preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermato-
zoa.
Brit.Poultry Sci. 25, 547-553
- MANN, T. (1964)
The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.
Methuen & Co., Ltd., London
- MANN, T. und LUTWAK-MANN, C. (1981)
Male reproductive function and semen.
Springer-Verlag; Berlin-Heidelberg
- MASUDA, H.; SOEJIMA, A. und WAIDE, Y. (1974)
Study on the deep freezing preservation of chicken semen.
Bull.of the Nat.I.of Anim.Ind.Japan, No 28, 33-40
- MATSUMOTO, Y.; TERADA, T. und TSUTSUMI, Y. (1985)
Glutamic Oxaloacetic Transaminase released from chicken sperma-
tozoa during freeze-thaw procedures.
Poultry Sci. 64, 718-722

- MCCARTNEY, M.G. (1976)
The effect of semen dosage and insemination frequency on the fertility of broiler breeder hens.
Poultry Sci. 55, 669-671
- McDANIEL, G.R. (1976)
Artificial insemination for broilers.
Poultry Int. 15 (8), 18-24
- McDANIEL, G.R. und COLEMAN, M.A. (1975)
The effect of frequency of artificial insemination on fertility and embryonic mortality.
Poultry Sci. 54, 1791-1792
- McDANIEL, G.R. und SEXTON, T.J. (1977)
Frequency of semen collection in relation to semen volume, sperm concentration and fertility in the chicken.
Poultry Sci. 56, 1989-1993
- MERYMAN, H.T. (1971)
Cryoprotective agents.
Cryobiology 8, 173-183
- MITCHELL, R.L.; BUCKLAND, R.B.; FORGRAVE, L. und BAKER, R.D. (1975)
A simple controlled rate freezing apparatus as applied to freezing poultry semen.
Poultry Sci. 54, 1796
- MITCHELL, R.L. und BUCKLAND, R.B. (1976a)
A note on the lack of difference in fertility between old and young hens when inseminated with frozen semen.
Poultry Sci. 55, 1161-1162
- MITCHELL, R.L. und BUCKLAND, R.B. (1976b)
Fertility of frozen chicken semen after intravaginal and intra-uterine inseminations using various concentrations and equilibration times of DMSO and a range of freezing and thawing rates.
Poultry Sci. 55, 2195-2200
- MITCHELL, R.L.; BUCKLAND, R.B. und KENNEDY, B.W. (1977)
Heritability of fertility of frozen and fresh chicken semen and the relationship between the fertility of frozen and fresh semen.
Poultry Sci. 56, 1168-1177
- MUKHERJEE, T.K. (1974)
Effect of storage, diluents and collection of chicken semen on the semen quality and fertility.
Malaysian Vet.J. 5 (4), 152-156

- MUNRO, S.S. (1938)
Fowl sperm immobilization by a temperature media interaction
and its biological significance.
Quart.J.exp.Physiol. 27, 281-291
- NAGASE, H. und NIWA, T. (1964)
Deep freezing bull semen in concentrated pellet form.
I. Factors affecting survival of spermatozoa.
Proc.5.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. Trient 4, 410
- NEVO, A.C. und SCHINDLER, H. (1968)
Reversible inactivation of cock spermatozoa by temperature.
Proc.6.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. Paris 2, 1637-1640
- NEVILLE, W.J.; MAC PHERSON, J.W. und REINHART, B. (1971)
The contraceptive action of glycerol in chickens.
Poultry Sci. 50, 1411-1415
- NISHIYAMA, H. (1951)
On the motility of spermatozoa of the domestic cock in the
transparent fluid.
Science Bull.of the Fac.of Agric.Kyushu Univ. 13, 373-376
- OGASAWARA, F.X.; LORENZ, F.W. und BOBR, L.W. (1966)
Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in
domestic birds.
III. Intra-uterine insemination of semen from low-fecundity
cocks.
J.Reprod.Fert. 11, 33-41
- OGASAWARA, F.X.; LORENZ, F.W. und BENNETT, E. (1969)
Intravaginal and intramagnal insemination of stored chicken
semen.
Poultry Sci. 48, 1853-1854
- OGASAWARA, F.X. und FUQUAY, C.L. (1972)
The vital importance of the uterovaginal sperm-host glands for
the turkey hen.
Poultry Sci. 51, 1035
- PARK, R.; OGASAWARA, F.X. und MARQUEZ, B.J. (1978)
Fertility and hatchability of eggs from turkey hens inseminated
intravaginally or intramagnally with fresh or frozen-thawed
semen.
Proc.16.Wld's.Poultry Congr., Rio de Janeiro 8, 197-204
- PARKER, J.E. (1939)
An avian semen collector.
Poultry Sci. 18, 455-456

- PARKER, J.E. und ARSCOTT, G.H. (1971)
Fertility from evening and daytime artificial insemination of chickens.
Poultry Sci. 50, 304-306
- PARKES, A.S. (1951)
Preservation of spermatozoa at low temperatures.
Brit.Agric.Bull. 4, 227-228
- PAYNE, L.F. (1914)
Viability and activity of sperm cells and artificial insemination of the chicken.
Oklahoma Agr.Expt.Sta.Cir. 30, 1-8
- PHILLIP, L.E.; BUCKLAND, R.B. und BERNON, D.E. (1974)
A note on the relationship between the fertility of fresh semen and that stored varying lengths of time, and the effect of storage on duration and percent fertility.
Poultry Sci. 53, 2216-2218
- PINGEL, H. und HENKER, V. (1975)
Rationalisierung der künstlichen Besamung beim Huhn.
Tierzucht 29, 518-520
- PINGEL, H. und REIMSCHÜSSEL, U. (1975)
Ein Beitrag zur Flüssigkonservierung von Hahnen- und Putensperma.
Wiss.Zs.der Karl-Marx-Universität Leipzig,
Math.Nat. Reihe 24, 173-182
- PINGEL, H. und JEROCH, H. (1980)
Biologische Grundlagen der industriellen Geflügelproduktion.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 217-241
- POLGE, C. (1951a)
Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C.
Nature 167, 949-950
- POLGE, C. (1951b)
Conservation des spermatozoides de coq à des températures basses.
Proc.9.Wld's.Poultry Congr. Paris 3, 15
- POLGE, C.; SMITH, A.U. und PARKES, A.S. (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
Nature 164, 666
- RAUTENFELD, D.B. von (1973)
Zur Form und Funktion des Kopulationsorganes beim Haushahn.
Vet.-med. Diss. FU Berlin

- RAVIE, O. und LAKE, P.E. (1982)
Prediction of ice formation in fowl spermatozoa at particular cooling rates.
Cryoletters 3, 91-100
- RAVIE, O. und LAKE, P.E. (1984)
A comparison of glass ampoules and plastic straws as receptacles for freezing fowl semen.
Cryoletters 5, 201-208
- REINHART, B.S. und FISER, P.S. (1983)
Evaluation of artificial insemination techniques of fertility in laying hens.
Poultry Sci. 62, 2285-2287
- REMMERS, J. (1973)
Lichtmikroskopische Untersuchungen am Hoden, Nebenhoden und Samenleiter des Hahnes (*Gallus domesticus* L.).
Vet.-med. Diss. Ti.-Ho. Hannover
- ROHLOFF, D.; KLAOWONN, W.; GRIMM, R. und SCHUSTER, S. (1983)
Fortschritte bei der Haushuhnbesamung mit Tiefgefriersperma.
Verhandlungsbericht, 8.Vet.Human.Tagung, München, 72-74
- ROMMEL, W. (1963)
Die künstliche Besamung bei Haushuhn und Truthuhn.
Monatsh.Vet.med. 18, 403-411
- ROWE, A.W. (1966)
Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing.
Cryobiology 3, 12-18
- SAEID, J.M. und AL-SOUDI, K.A. (1975)
Seasonal variation in semen characteristics of White Leghorn, New Hampshire and Indigenous chicken in Iraq.
Brit.Poultry Sci. 16, 97-102
- SAEKI, Y. (1960)
Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl.
Poultry Sci. 39, 1354-1361
- SCHINDLER, H.; WEINSTEIN, S.; MOSES, E. und GABRIEL, I. (1955)
The effect of various diluents and storage times on the fertilizing capacity of cock semen.
Poultry Sci. 34, 1113-1117
- SCHINDLER, H.; VOLCANI, R. und WEINSTEIN, S. (1957)
A note on seasonal fluctuations in the motility of cock semen.
Poultry Sci. 36, 194-196

- SCHRAMM, G.-P. (1976)
Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hahnensperma in Pelletform.
Vet.-med. Diss. Humboldt Univ. Berlin
- SCHRAMM, G.-P. (1982)
Ein neues Medium zur Verdünnung und Flüssigkonservierung von Hahnensperma.
Monatsh.Vet.med. 37, 900-902
- SCHRAMM, G.-P. und LÖHLE, K. (1976)
Einfluß der Kryoprotektiva Glycerin, DMSO und Äthylenglycol sowie Glycerinadaptionszeit auf die in vitro Qualität des Hahnenspermas vor und nach Tiefgefrierkonservierung.
Archiv f.Tierzucht 19, 295-305
- SCHRAMM, R. (1975)
Studien zur Langzeitkonservierung von Hahnensperma mittelschwerer Rassen in flüssigem Stickstoff unter Anwendung der Paillettenmethode.
Monatsh.Vet.med. 30, 941-944
- SCHRAMM, R. (1980)
Einfluß unterschiedlicher Gefriertechnik bei der Langzeitkonservierung von Geflügelsperma auf Befruchtung des Samens und Schlupfergebnis.
25.Geflügelvortragstagung, Leipzig, 336-342
- SCHRAMM, R. und LÖHLE, K. (1978)
Einfluß unterschiedlicher Kältetemperaturen und Gefrierverfahren auf Motilität und Fertilität der Samenzellen von White Rock Hähnen bei Verwendung des Kryoprotektivums Äthylenglycol.
Monatsh.Vet.med. 33, 262-265
- SCHUMMER, A. (1973)
Anatomie der Hausvögel.
Band V von NICKEL-SCHUMMER-SEIFERLE, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.
Parey-Verlag, Berlin-Hamburg
- SCHUSTER, S. (1980)
Ein Beitrag zur Tiefgefrierung von Geflügelsperma.
Vet.med.Diss. FU Berlin
- SCHWARZE, E. und SCHRÖDER, L. (1985)
Kompendium der Geflügelanatomie (1. Aufl. 1966).
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- SCOTT, T.; ODERKIRK, A.H.F.; BUCKLAND, R.B. und KENNEDY, B.W. (1977)
Three generations of selection for fertility of frozen chicken semen.
Poultry Sci. 56, 1755

- SEXTON, T.J. (1972)
Comparison of various cryopreservative agents on washed chicken spermatozoa.
1. Effect on respiration and motility.
2. Effect on fertility and hatchability.
Poultry Sci. 51, 1863-1864
- SEXTON, T.J. (1973)
Effect of centrifugation and repeated washing on the fertilizing capacity of fowl spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 32, 101-104
- SEXTON, T.J. (1974)
Comparison of various cryoprotective agents on washed chicken spermatozoa.
4. Metabolism and release of glutamic-oxalacetic transaminase.
Poultry Sci. 53, 284-287
- SEXTON, T.J. (1975)
Comparison of various cryoprotective agents on washed chicken spermatozoa.
5. Effect of glucose, sucrose and polyvinylpyrrolidone.
Poultry Sci. 54, 1297-1299
- SEXTON, T.J. (1976a)
Use one male for 160 hens with semen diluents.
Poultry Int. 15 (8), 26-28
- SEXTON, T.J. (1976b)
Studies of the fertility of frozen fowl semen.
Proc.8.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. Krakau, 1079-1081
- SEXTON, T.J. (1977)
A new poultry semen extender.
1. Effect of extension on the fertility of chicken semen.
Poultry Sci. 56, 1443-1446
- SEXTON, T.J. (1980)
Optimal rates for cooling chicken semen from +5° to -196°C.
Poultry Sci. 59, 2765-2770
- SEXTON, T.J. (1981a)
Effect of prefreeze treatment on the fertilizing capacity of frozen chicken semen.
Poultry Sci. 60, 1552-1557
- SEXTON, T.J. (1981b)
Sperm number required for maximum fertility of chicken semen processed for freezing.
Reprod.Nutr.Develop. 21, 1043-1048

- SEXTON, T.J. (1983)
Maximizing the utilization of the male breeder: A Review.
Poultry Sci. 62, 1700-1710
- SEXTON, T.J. und FEWLESS, T.A. (1977)
Studies on the artificial insemination of egg and meat type chickens.
Poultry Sci. 56, 1359
- SEXTON, T.J. und FEWLESS, T.A. (1978)
A new poultry semen extender.
2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C.
Poultry Sci. 57, 277-284
- SEXTON, T.J.; BUCKLAND, R.B. und LOPEZ, R. (1978)
Comparison of two procedures for freezing semen from cocks of high and low fertility with frozen semen.
Poultry Sci. 57, 550-552
- SHAFFNER, C.S. (1942)
Longevity of fowl spermatozoa in frozen condition.
Science 96, 337
- SHAFFNER, C.S. (1964)
Observations on freezing chicken semen.
Proc. 5. Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Trient III, 426-429
- SHAFFNER, C.S.; HENDERSON, E.W. und CARD, C.G. (1941)
Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions.
Poultry Sci. 20, 259-265
- SIEGEL, P.B. und BEANE, W.C. (1963)
Semen characteristics of chicken maintained in all male flocks and in individual cages.
Poultry Sci. 42, 1028-1030
- SMITH, A.U. und POLGE, C. (1950)
Survival of spermatozoa at low temperatures.
Nature 166, 668-669
- SPALLANZANI, L. (1776)
Opuscoli di Fisica Animale e Vegetabile.
Presso lo Societa Tipographica Modena.
(Tracts on the nature of animals and vegetables, Creech & White, Edinburgh, 1799)
zit. nach MANN und LUTWAK-MANN (1981)
- TAKEDA, A. (1964)
Behaviour of spermatozoa in the genital tract of the hen.
1. Presence of spermatozoa in the oviduct.
Jap. Poultry Sci. 1 (1), 19-31

- TAKEDA, A. (1967)
Behaviour of spermatozoa in the genital tract of the hen.
4. Persistence of spermatozoa and their transport in the hen's oviduct following artificial insemination.
Jap.Poultry Sci. 4 (2), 62-67
- TAKEDA, A. (1974)
The transport of spermatozoa in the vagina of the hen.
Jap.Poultry Sci. 11 (2), 45-54
- TERADA, T. und WATANABE, M. (1976)
Effects of addition of cock blood serum to semen diluents on the motility, glucose utilization and oxygen consumption of cock spermatozoa.
Jap.Poultry Sci. 13 (6), 223-228
- TERADA, T. und WATANABE, M. (1978)
Effects of seminal plasma on the motility and metabolism of cock spermatozoa.
Jap.J.Zootech.Sci. 49 (1), 47-53
- TERADA, T.; INOUE, A. und WATANABE, M. (1978)
Effects of homologous and heterologous fresh blood serum on motility of cock spermatozoa.
Jap.J.Zootechn.Sci. 49 (7), 510-516
- TERADA, T.; MAEDA, T.; TAKESHITA, N. und TSUTSUMI, Y. (1983a)
Ultrastructural damages of fowl spermatozoa due to freezing in the pelleted form.
Proc.5.World Conf.Anim.Prod. Tokyo, 181-182
- TERADA, T.; MAEDA, T.; WATANABE, M. und TSUTSUMI, Y. (1983b)
Oxygen consumption rate as a measurement of freeze-induced damage to chicken spermatozoa.
Poultry Sci. 62, 2271-2275
- THIBAULT, C. (1973)
Sperm transport and storage in vertebrates.
J.Reprod.Fert. 18, 39-53
- TINJAKOV, G.G. (1933)
Novyi metod polucenija spermy u kurinyh.
(Eine neue Methode der Spermagewinnung beim Geflügel.)
Probl.Zhivotn.Moscow VI, 90-92
- TSUKUNAGA, S. (1972)
Close relationship between frequency of neck-bent spermatozoa and subfertility of semen in the fowl.
Proc.7.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. München 2, 1677-1680
- TULLOCH, B.R. (1962)
A modified technique for the collection of poultry semen.
South Afr.J.Agric.Sci. 5 (1), 153-155

- VAN DRIMMELEN, G.C. (1945)
Intraperitoneale insemination of birds.
J.South Afr.Vet.Med.Assoc. 16, 1-6
- VAN DRIMMELEN, G.C. (1946)
"Spermnests" in the oviduct of the domestic hen.
J.South Afr.Vet.Med.Assoc. 17, 42-52
- VAN DRIMMELEN, G.C. (1951)
Artificial insemination of birds by the intraperitoneal route.
Onderstepoort J.Vet.Res.Suppl. 1, 212
- VAN KREY, H.P.; OGASAWARA, F.X. und LORENZ, F.W. (1964)
Relative storage potential of the uterovaginal and infundibular
sperm glands.
Poultry Sci. 43, 1373
- VAN WAMBEKE, F. (1967)
The storage of fowl spermatozoa.
I. Preliminary results with new diluents.
J.Reprod.Fert. 13, 571-575
- VAN WAMBEKE, F. (1972)
Fertility and hatchability results with fowl spermatozoa stored
in fresh and freeze-dried diluent.
Brit.Poultry Sci. 13, 179-183
- VAN WAMBEKE, F. (1976)
The effect of two different methods of semen collection on
fertility and hatchability results obtained with stored fowl
semen.
Prod.5.Europ.Poultry Conf. Malta 2, 1230-1240
- VAN WAMBEKE, F. (1977)
The effect of tonicity of storage media for fowl semen on the
occurrence of neck-bending spermatozoa, fertility and hatcha-
bility.
Brit.Poultry Sci. 18, 163-168
- VAN WAMBEKE, F. (1979)
Is there a future for AI with broiler breeders?
Poultry Int. 18 (3), 16-23
- VAN WAMBEKE, F. (1980)
Verdünnung und Lagerung von Geflügelsperma.
25.Int.Geflügelvortragstagung, Leipzig, 329-335
- WATANABE, M. (1967)
Studies on deep-freezing preservation of chicken semen.
J.Fac.Fish.Anim.Husb. Hiroshima Univ. 7, 9-23

- WATANABE, M. (1972)
Fertility of fowl semen frozen for two years.
Proc.7.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. München 2, 1685-1689
- WATANABE, M.; MIURA, M. und MODA, Y. (1970)
Studies of deep freezing method using liquid nitrogen.
Wild's.Poultry Sci. 26, 821
- WATANABE, M.; TERADA, T. und SHIRAKAWA, Y. (1977)
A diluent for deep freezing preservation of fowl spermatozoa.
J.Fac.Fish.Anim.Husb. Hiroshima Univ. 16 (1), 59-64
- WATANABE, M. und TERADA, T. (1980a)
Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9 years).
J.Fac.Appl.Biol.Sci. Hiroshima Univ. 19 (2), 155-159
- WATANABE, M. und TERADA, T. (1980b)
Studies on the deep freezing of fowl semen in pellet form.
Proc.9.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. Madrid V, 477-479
- WESTFALL, F.D. (1978)
Effects of glycerol and its removal on chicken spermatozoa.
Thesis, University of Georgia, Athens
- WESTFALL, F.D. und HARRIS Jr., G.C. (1975)
The ability of cryopreservatives to prevent motility loss and
freeze-thaw damage to the acrosome of chicken spermatozoa.
Cryobiology 12, 89-92
- WESTFALL, F.D. und HOWARTH Jr., B. (1976)
The effect of time of glycerol deposition on fertility of
chickens.
Poultry Sci. 56, 2105-2106
- WESTFALL, F.D. und HOWARTH Jr., B. (1977a)
Duration of the antifertility effect of glycerol in the chicken
vagina.
Poultry Sci. 56, 924-925
- WESTFALL, F.D. und HOWARTH Jr., B. (1977b)
The effects of glycerol removal on cation concentration and
morphology of chicken spermatozoa.
Poultry Sci. 56, 1454-1456
- WHITE, I.G. (1953)
The effect of washing on the motility and metabolism of ram,
bull and rabbit spermatozoa.
J.exp.Biol. 30, 200-213
- WILCOX, F.H. (1958a)
Changes in the pH of semen of the domestic cock as affected by
temperature and frequency of collection.
Poultry Sci. 37, 444-449

- WILCOX, F.H. (1958b)
The effect of dilution and concentration of chicken semen on fertility.
Poultry Sci. 37, 1357-1362
- WILCOX, F.H. (1959)
Effect of the addition of carbohydrates after storage on the motility and fertilizing ability of chicken sperm.
Poultry Sci. 38, 1162-1168
- WILCOX, F.H. (1960)
Effect on fertility of temperature, handling methods, LAKE's solution and the addition of egg yolk and sugars to the diluent used in storing chicken semen.
Poultry Sci. 39, 459-467
- WILCOX, F.H. und CLARK, R.G. (1962)
Semen dilution during storage and washing.
Poultry Sci. 41, 1091-1096
- WILLIAMSON, R.G.; ETCHES, R.J.; REINHART, B.S. und MAC PHERSON, J.W. (1981)
The effect of cooling rate before freezing and the temperature of the semen upon addition of DMSO on the fertilizing of chicken semen stored at -196°C.
Reprod.Nutr.Develop. 21, 1033-1042
- WILSON, H.R.; PIESCO, N.P.; MILLER, E.R. und NESBETH, W.G. (1979)
Prediction of the fertility potential of broiler breeder males.
Wild's.Poultry Sci. 35, 95-118
- WINBERG, H. (1941)
Über das physiologische Verhalten der Vogelspermien bei variierenden Temperaturen.
Arch.Zool. 33, A. No. 7, 12
- WISHART, G.J. (1981)
The effect of continuous aeration on the fertility of fowl and turkey semen stored above 0°C.
Brit.Poultry Sci. 22, 445-450
- WISHART, G.J. (1984)
Quantitation of the fertilizing ability of frozen/thawed fowl semen.
Poultry Sci. 63, 206-207
- WOLFF, E.; MITCHELL, R.L. und BUCKLAND, R.B. (1976)
An examination of natural selection as a tool to improve the post-freezing fertility of chicken semen.
Poultry Sci. 55, 2107

- YAMANE, J.; TSUKUNAGA, S. und TAKAHASHI, T. (1966)
"Hiroshima" method of artificial insemination of the domestic
fowl.
J.Fac.Fish.Anim.Husb. Hiroshima Univ. 6, 395-429
- YAMANE, J. (1972)
A peculiar deformation of cock spermatozoa (neck-bending)
caused by osmo- and thermoshock, and its significance for arti-
ficial insemination.
Proc.7.Int.Congr.Anim.Repr.A.I. München 2, 1681-1684
- YOUSIF, Y.F.; ANSAH, G.A. und BUCKLAND, R.B. (1984)
Effect of selection for fertility of frozen-thawed semen in
chickens on the fertility of fresh and stored semen.
Poultry Sci. 63, 1475-1480

Herrn Prof.Dr. D.Rohloff und Herrn Prof.Dr. P.Horst danke ich für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Ich danke allen Angehörigen der Klinik, die mir bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren; insbesondere danke ich den Tierpflegern Herrn H.Braun und Herrn M.Schimmel, die mir bei der Pflege und Entsamung der Hähne geholfen haben.

Mein Dank gilt auch den Angehörigen des Instituts für Tierproduktion, die mir bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren. Insbesondere danke ich Herrn H.-W.Rauen und den technischen Assistentinnen Frau R.Lang und Frau B.Kolb, die mir bei der Besamung der Hennen geholfen haben.

Weiterhin danke ich Herrn Prof.Dr. H.Weiß und Herrn S.Christiansen aus der Fachrichtung Biometrie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin für die freundliche Beratung bei der Auswertung der Versuchsergebnisse.

LEBENS LAUF

Am 25.12.1951 wurde ich, Uwe Bielefeldt, in Lübeck-Schönböcken als erster Sohn des Landwirtes Heinrich Bielefeldt und seiner Frau Hildegard, geb. Hell, geboren.

- | | |
|-------------|---|
| 1958 - 1962 | Besuch der Grundschule Lübeck-Schönböcken |
| 1962 - 1967 | Besuch der Ernst-Moritz-Arndt-Realschule in Lübeck |
| 1967 - 1971 | Ausbildung zum Verwaltungsbeamten bei der Stadtverwaltung der Hansestadt Lübeck |
| 1972 - 1973 | Grundwehrdienst in Neumünster |
| 1973 - 1978 | Verwaltungsbeamter bei der Stadtverwaltung der Hansestadt Lübeck |
| 1975 - 1978 | Besuch des städt. Abendgymnasiums der Hansestadt Lübeck |
| 1978 - 1984 | Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin |
| 01.03.1984 | Tierärztliche Prüfung |
| 13.03.1984 | Approbation als Tierarzt |



